

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO/A EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN
LA BIOSÍNTESIS DE LIPOPÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN *Bacillus*
megaterium MEDIANTE RT-qPCR**

AUTORES:

**ANDRÉS SEBASTIÁN CADENA PAREDES
KATHERINE ALEJANDRA MEDRANO JARA**

DIRECTORA:

VIVIANA PAMELA CHILUISA UTRERAS

Quito, febrero del 2020

Cesión de derechos de autor

Nosotros, Andrés Sebastián Cadena Paredes con documento de identificación N° 1721824512 y Katherine Alejandra Medrano Jara con documento de identificación N° 1750400994, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación titulado: "Evaluación de la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos en *Bacillus megaterium* mediante RT-qPCR", mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero/a en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, febrero del 2020.

Andrés Sebastián Cadena Paredes

C.I. 1721824512

Katherine Alejandra Medrano Jara

C.I. 1750400994

Declaratoria de coautoría de la docente tutora

Yo, Viviana Pamela Chiluisa Utreras, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “Evaluación de la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos en *Bacillus megaterium* mediante RT-qPCR”, realizado por Andrés Sebastián Cadena Paredes y Katherine Alejandra Medrano Jara, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero del 2020.



Viviana Pamela Chiluisa Utreras

C.I. 1713168258

Dedicatoria

A mi madre Mairan, por ser el más grande ejemplo y apoyo en mi vida y que ha demostrado ser la persona más perseverante y darme la oportunidad de crecer profesionalmente. A mi abuela Elena por ser mi segunda madre y estar incondicionalmente en cualquier circunstancia. A mi querida sobrina Emma, que anhelo verla crecer como la gran persona que debe ser. A mi tío Ramiro que en paz descanse. Sin duda a mis grandes amigos Marcos Celi por ser como un hermano en cada momento difícil, Bryan Ramos y Dennise Alvear que han estado presente en mi vida académica.

Andrés Sebastián Cadena Paredes

A Dios por ser el centro de mi vida y bendecirme cada día. A mi madre Jeisenia por ser mi pilar fundamental, mi soporte, mi guía, mi mayor ejemplo, cada logro en mi vida es por ella y para ella. A mi hermana Caroline por ser la alegría de mi vida y es un honor para mí poder ser ejemplo para ella. A mis abuelitos Nancy y Luis por brindarme su apoyo y respaldo incondicional a lo largo de mi formación académica y personal. A mi novio Sebastián por ser mi mejor amigo y compañero, por estar siempre a mi lado y brindarme su apoyo, amor y confianza.

Katherine Alejandra Medrano Jara

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana por abrirnos las puertas y ser el lugar de formación de grandes profesionales y personas.

A la Ing. Viviana Chiluisa Utreras MSc. quien no solo fue el pilar del presente trabajo, sino también de nuestra vida académica, personal, profesional y ha estado a cada momento para apoyarnos.

Al ingeniero Daniel Acurio por su incondicional apoyo y contribución con la investigación y su disposición para solventar aquellas inquietudes en el transcurso del trabajo de titulación. Al grupo de investigación BIOARN que ha colaborado cada uno con un granito de arena.

Índice General

Introducción	1
Capítulo I.....	6
1. Marco Conceptual	6
1.1 Familia <i>Bacillaceae</i>	6
1.2 Género <i>Bacillus</i>	6
1.3 Especie <i>Bacillus megaterium</i>	7
1.3.1 Taxonomía	8
1.3.2 Descripción Morfológica	8
1.4 <i>Bacillus megaterium</i> como controlador biológico.....	9
1.4.1 Lipopéptidos sintetizados por <i>Bacillus megaterium</i>	10
1.4.2 Hongos fitopatógenos sensibles a <i>Bacillus megaterium</i>	13
1.4.3 <i>Alternaria</i> sp.	14
1.4.4 <i>Botrytis</i> sp.	14
1.4.5. Método de evaluación de antagonismo: cultivo dual.....	15
1.5. Métodos de cuantificación de lipopéptidos	16
1.5.1. Métodos químicos.....	17
1.5.2. Métodos moleculares	17
1.6. Expresión génica.....	18
1.6.1. Retrotranscripción.....	18
1.6.2. Cuantificación de la expresión génica mediante PCR tiempo real	19

Capítulo II	21
2. Marco Metodológico	21
2.1. Localización del estudio	21
2.2. Pruebas de antagonismo: cultivo dual	21
2.2.1. Preparación de los inóculos.....	21
2.2.2. Cultivo dual: <i>B. megaterium</i> frente <i>Alternaria</i> sp. y <i>Botrytis</i> sp.	22
2.3. Fermentación líquida	22
2.3.1. Preparación del inóculo.....	22
2.3.2. Fermentación.....	22
2.4. Extracción de ARN.....	23
2.4.1. Extracción de ARN de <i>Bacillus megaterium</i> proveniente del cultivo dual	23
2.4.2. Extracción de ARN de <i>Bacillus megaterium</i> proveniente de la fermentación líquida	24
2.4.3 Cuantificación de ARN.....	24
2.5. Transcripción inversa.....	25
2.7. Cuantificación relativa mediante RT-qPCR	26
2.7.1. Selección de primers	26
2.7.2 Amplificación: PCR tiempo real.....	26
2.7.3. Cuantificación relativa	27
2.8. Análisis estadístico	28
2.8.1. Factor de estudio	28
2.8.2. Diseño experimental	28

Capítulo III	31
3. Resultados y Discusión.....	31
3.1 Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial.....	31
3.2 Expresión del gen FEND en <i>Bacillus megaterium</i> en crecimiento en placa	37
3.3 Expresión génica de ITUDI en <i>Bacillus megaterium</i> en crecimiento en placa	42
3.4 Expresión génica de FEND e ITUDI en <i>Bacillus megaterium</i> en fermentación	46
Conclusiones	50
Recomendaciones.....	52
Referencias	53
Anexos.....	65

Índice de Tablas

Tabla 1. Taxonomía de <i>Bacillus megaterium</i>	8
Tabla 2. Conformación de los tratamientos.....	29
Tabla 3. Porcentaje de Inhibición de crecimiento radial	34
Tabla 4. Análisis de varianza para la variable porcentaje de inhibición de crecimiento radial para <i>Bacillus megaterium</i> frente a <i>Botrytis</i> sp. y <i>Alternaria</i> sp. a los diferentes días de incubación y la interacción de ambas variables.	35
Tabla 5. Variación de la expresión génica relativa (EGR) de FEND en <i>Bacillus megaterium</i> solo y en antagonismo.	37
Tabla 6. Análisis de varianza para la variable variación de la expresión génica relativa de FEND para <i>Bacillus megaterium</i> frente a <i>Botrytis</i> sp. y <i>Alternaria</i> sp. a los diferentes días de incubación y la interacción de ambas variables.	39
Tabla 7. Variación de la expresión génica relativa (EGR) de ITUDI en <i>Bacillus megaterium</i> solo y en antagonismo.	42
Tabla 8. Análisis de varianza para la variable variación de la expresión génica relativa de ITUDI para <i>Bacillus megaterium</i> frente a <i>Botrytis</i> sp. y <i>Alternaria</i> sp. a los diferentes días de incubación y la interacción de ambas variables.	43
Tabla 9. Variación de la expresión génica relativa (ERG) de FEND e ITUDI en <i>Bacillus megaterium</i> en fermentación.....	46
Tabla 10. Análisis de varianza para la variable variación de la expresión génica relativa en <i>Bacillus megaterium</i> a los diferentes días en fermentación.	47

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama experimental.....	28
Figura 2. Cultivo dual y cultivo de hongos al día 1 de incubación.	31
Figura 3. Cultivo dual y cultivo de hongos al día 5 de incubación.	32
Figura 4. Cultivo dual y cultivo de hongos al día 9 de incubación.	33
Figura 5. Representación del porcentaje de inhibición de crecimiento radial de <i>Alternaria</i> sp. y <i>Botrytis</i> sp., mediante la prueba Tukey 5 %.....	36
Figura 6. Representación de la variación de la expresión génica relativa de FEND en escala logarítmica base 2.....	40
Figura 7. Representación de la variación de la expresión génica relativa de ITUDI en escala logarítmica base 2.....	44
Figura 8. Representación de la variación de la expresión génica relativa en escala logarítmica base 2 de FEND e ITUDI en <i>Bacillus megaterium</i> en fermentación.	48

Índice de Anexos

Anexo 1. Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de <i>Bacillus megaterium</i> al día 1.....	65
Anexo 2. Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de <i>Bacillus megaterium</i> al día 5.....	66
Anexo 3. Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de <i>Bacillus megaterium</i> al día 9.....	67
Anexo 4. Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de <i>Bacillus megaterium</i> frente <i>Botrytis</i> sp., al día 1.....	68
Anexo 5. Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de <i>Bacillus megaterium</i> frente <i>Botrytis</i> sp., al día 5.....	69
Anexo 6. Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de <i>Bacillus megaterium</i> frente <i>Botrytis</i> sp., al día 9.....	70
Anexo 7. Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de <i>Bacillus megaterium</i> frente <i>Alternaria</i> sp., al día 1.....	71
Anexo 8. Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de <i>Bacillus megaterium</i> frente <i>Alternaria</i> sp., al día 5.....	72
Anexo 9. Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de <i>Bacillus megaterium</i> frente <i>Alternaria</i> sp., al día 9.....	72
Anexo 10. Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de <i>Bacillus megaterium</i> en fermentación al día 1.	74
Anexo 11. Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de <i>Bacillus megaterium</i> en fermentación al día 2.	75
Anexo 12. Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de <i>Bacillus megaterium</i> en fermentación al día 3.	76

Anexo 13. Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de <i>Bacillus megaterium</i> en fermentación al día 5.	77
--	----

Resumen

Uno de los principales problemas en la agricultura es controlar fitopatógenos, para ello ha surgido la necesidad de aplicar agentes biológicos como controladores de plagas y evitar el uso de pesticidas.

Por lo tanto, en la presente investigación se planteó evaluar la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos en *B. megaterium* mediante RT-qPCR. La expresión génica relativa (EGR) se evaluó para los genes FEND e ITUDI que codifican fengicinas e iturinas respectivamente. En primera etapa se realizó pruebas de antagonismo de *B. megaterium* frente a *Alternaria* sp. y *Botrytis* sp., durante nueve días, evidenciándose que la bacteria puede controlar el crecimiento de ambos patógenos. Para corroborar este resultado, la segunda etapa consistió en pruebas moleculares; se evaluó la expresión en nueve días de los genes FEND e ITUDI de muestras pertenecientes a los cultivos duales anteriores, se obtuvo que la expresión del gen FEND de *Bacillus megaterium* frente a *Alternaria* sp. aumentó en 20,16 veces y frente a *Botrytis* sp. aumentó 3,20 veces, ambos al día 5. De igual manera se trató para la bacteria en fermentación, a diferentes tiempos, dando como resultados que la expresión de FEND e ITUDI aumentó en 95,14 veces y 18,70 veces, respectivamente, concluyendo así que existe un aumento en la expresión génica cuando *Bacillus megaterium* se encuentra frente al patógeno específico a ser controlado y cuando el crecimiento de *Bacillus megaterium* se da por fermentación líquida, la expresión de los genes es aún mayor.

Palabras clave: Hongos fitopatógenos, antagonismo, capacidad biocontroladora, fermentación.

Abstract

One of the main problems of agriculture is to control phytopathologies, due to this factor, there is a need to apply biological agents as pest controllers to prevent the use of chemicals.

Therefore, in the present research was performed to evaluate the expression of genes involved in antimicrobials lipopeptides' biosynthesis in *B. megaterium* by using RT-qPCR. The relative gene expressions (RGE) evaluated were the FEND and ITUDI genes which encode for fengicines and iturines respectively. The first stage consisted of antagonist tests of *B. Megaterium* vs. *Alternaria* sp. and *Botrytis* sp., performed for nine days, evidencing that the bacteria controlled growth of both pathogens. To corroborate this result, the second stage consisted of various molecular tests, evaluated the expression of FEND and ITUDI genes during nine days; which were taken from the dual microbial culture previously discussed, resulting in the expression of the FEND gene of *Bacillus megaterium* vs. *Alternaria* sp. increased by 20,16 times and against *Botrytis* sp. increased 3,20 times, both at day 5. In the same way the bacteria were put into a fermentation process, in different times, giving an increase of 95,14 and 18,70 times more than the normal expression of the FEND and ITUDI genes respectively, concluding that there is an actual increase in the genetic expression when *Bacillus Megaterium* grows next to a pathogen, as previously reported. Thus, the growth of *Bacillus Megaterium* in fermentation conditions increases the genetic expression even more.

Keywords: Phytopathogenic fungi, antagonism, biocontroller capacity, fermentation.

Introducción

En la agricultura a nivel mundial, los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades de pre y post cosecha, estos son altamente incidentes en cultivos de hortalizas, cereales y frutales, siendo responsables de pérdidas económicas cuantiosas (Agrios, 2005). Se estima que las pérdidas de cultivos oscilan entre el 5 y 25 % en países desarrollados y del 20 al 50 % en países en desarrollo (FHIA, 2007).

El daño que ocasionan no sólo es en cuanto al aspecto económico, sino también existen pérdidas en producción biológica, es decir, se presentan alteraciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos (Agrios, 2005). También surgen efectos en la producción tales como: las variaciones en los precios, cambios en los salarios agrícolas y problemas en las industrias que fabrican productos procesados. Por otro lado, pueden surgir consecuencias negativas en la nutrición y seguridad alimentaria en los países en desarrollo por una falta de control de las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. Las medidas para combatirlas generalmente implica gastos que incluyen los costes de inspección, seguimiento, prevención y reacción, todos estos efectos ocasionan problemas en la alimentación mundial (FAO, 2001).

Un gran número de hongos han sido identificados y caracterizados como causantes del deterioro patológico de cultivos de alto consumo, siendo los más comunes, especies de los géneros: *Alternaria*, *Botrytis*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Mucor* (FHIA, 2007).

En Ecuador, *Alternaria* sp. y *Botrytis* sp. son dos de los principales hongos que más enfermedades causan en cultivos de gran interés comercial (Proaño, 2014). Por ejemplo, *Alternaria solani* causa daños en cultivos de tomate (Pérez-Martínez, 2016), *Alternaria brassicae* afecta fuertemente a plantas del género *Brassica* (Ayuke *et al.*, 2017).

En cuanto a *Botrytis* sp. es un hongo más agresivo, se ha informado que las especies de *Botrytis* atacan un total de 596 géneros de plantas vasculares, la mayoría (580) pertenecen al género *Spermatophyta*, 15 al *Pteridophyta* y solo 1 a *Lycopodiophyta*. Geográficamente, *Botrytis* sp. ataca en cualquier zona que se cultiven sus plantas hospedadoras, desde áreas tropicales y subtropicales hasta zonas templadas frías de las regiones del hemisferio del norte y sur, incluso regiones donde las plantas se cultivan en climas extremadamente fríos o en el desierto (Elad, Pertot, Cotes Prado, & Stewart, 2016), un cultivo que principalmente se ve afectado por este hongo es el de frutilla (Tomas-Grau *et al.*, 2018).

Las enfermedades en las plantas son un grave problema en la producción de cualquier tipo de cultivo, por lo que un aspecto de suma importancia a considerar es su control, para el cual existen diferentes métodos de los cuales los más utilizados siempre han sido los plaguicidas y agentes químicos debido a su alta eficiencia. Sin embargo, su empleo intensivo y desmedido ha causado efectos negativos sobre el medio ambiente y la calidad de vida de las personas (Martínez *et al.*, 2017). El uso mundial de plaguicidas para el 2018 ha aumentado a 200,5 millones de toneladas, un 25 % más que el registrado en el 2008 (FAO, 2018).

Debido a los problemas expuestos, han surgido alternativas como el control biológico, que se lo define como el uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con la finalidad de reducir o eliminar los daños que causan en las plantas (Martínez *et al.*, 2017).

Bacillus megaterium es un microorganismo del cual se ha descrito su potencial como promotor de crecimiento y su capacidad para controlar enfermedades fitopatógenas, debido a su capacidad para producir varios antibióticos, lipoproteínas y enzimas hidrolíticas. Esta bacteria podría ser una gran alternativa prometedora para controlar patógenos con una gran versatilidad ecológica (Knight *et al.*, 2018).

Determinar específicamente cuando es adecuado usar un biocontrolador, en que concentración y cuando ejerce su mayor efecto es difícil lograrlo en pruebas *in vivo*, pero los métodos moleculares son una mejor alternativa. De esta manera la RT-qPCR permite cuantificar la expresión génica y por lo tanto se puede determinar bajo que concentraciones y en qué tiempo se expresan en mayor medida genes de interés (Dragovoz, Tkachuk, Avdeeva, Grabova, & Zelena, 2016; Sajitha & Dev, 2016; Velho *et al.*, 2015).

Por lo tanto, la presente investigación busca responder a las siguientes preguntas de investigación: ¿En qué nivel se expresan los genes de fengicinas e iturinas en *B. megaterium* cuando se encuentra en antagonismo frente a *Botrytis* sp. y *Alternaria* sp., respecto al tiempo? y ¿En qué nivel se expresan los genes de fengicinas e iturinas en *B. megaterium* fuera de antagonismo a diferentes condiciones de crecimiento, respecto al tiempo?

Bacillus megateirum es una bacteria empleada en el ámbito agrícola por sus diversas funciones, entre ellas, por ser un microorganismo promotor de crecimiento para las plantas, además, existen indicios de ser un potencial biocontrolador para aquellos patógenos fúngicos que provocan importantes pérdidas económicas en la agricultura y entre los más nombrados están *Botrytis* sp. y *Alternaria* sp. (Angulo, Sanfuentes, Rodríguez, & Sossa, 2014; El-Gremi, Draz, & Youssef, 2017; Sánchez-Pila, 2016).

Bacillus megaterium ha logrado ser considerado como un controlador biológico, ya que presenta indicios de poseer metabolitos capaces de inhibir el crecimiento de algunos patógenos y los más importantes para la investigación son: Fengicinas e Iturinas, (González-Jaramillo, Aranda, Teruel, Villegas-Escobar, & Ortiz, 2017; Mannaa & Kim, 2018).

En *Bacillus megaterium* se ha evidenciado la presencia de genes antibióticos (Saravanakumar, Thomas, & Banwarie, 2019); pero también es importante entender su expresión génica, ya que ayuda a discriminar hasta que nivel puede llegar la expresión de genes de interés, en qué

momento se registran cambios a nivel molecular, si acaso está influenciado por algún factor extrínseco e intrínseco o simplemente se mantiene constante a lo largo del tiempo.

Para ello, la biología molecular ayuda a evaluar el nivel de la expresión génica, utilizando genes house-keeping, que son aquellos que mantienen su expresión en un nivel constante a lo largo del tiempo, por lo tanto ayudan a comparar si la expresión de los genes de interés son altos o bajos (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2011), y esta comparación se la realiza mediante la técnica de RT-qPCR que mide el nivel de expresión interpretando el cDNA obtenido, con la ventaja que brinda un buen límite de detección, sensibilidad y especificidad (Chiluisa-Utreras, Vaca, Chicaiza, & Peñaherrera, 2017).

Saravanakumar, *et al.* (2019), en su estudio menciona que *B. megaterium* puede inhibir el crecimiento de *Alternaria* sp., pero por ser parte de un género muy importante en temas de control biológico, es posible que *Bacillus megaterium* pueda incluso inhibir el crecimiento de *Botrytis* sp. (Hinarejos *et al.*, 2016; Jha, Joshi, & Geetha, 2016; Lisboa, 2003). Lo que no está claro es, si a nivel molecular los genes de fengicinas e iturinas, modifican su expresión aumentando o disminuyendo a causa de factores bióticos (crecimiento frente a hongos) o por factores abióticos (tiempo) (Fan, Ru, Zhang, Wang, & Li, 2017; Yaseen, Gancel, Béchet, Drider, & Jacques, 2017). Debido a esto, es necesario realizar una evaluación de la expresión génica partiendo del ARNm de *Bacillus megaterium* e interpretar el cDNA de cada gen obtenido, para poder identificar qué factores influyen en la variación de la expresión de los genes que codifican para lipopéptidos antimicrobianos.

Con ello, esta investigación brinda un aporte teórico y aplicativo para el campo científico, biotecnológico y molecular, además del análisis de sistemas bióticos que pueden ser utilizados en el campo agrícola, porque ofrece un estudio completo de un agente controlador de plagas evidenciando que a nivel microbiológico y molecular *Bacillus megaterium* puede ser la mejor

alternativa para enfrentar problemas agrícolas. De igual manera se genera un aporte social ya que estos datos son de vital importancia para la comunidad agrícola, puesto que tener a la mano opciones o alternativas para innovar las técnicas en la agricultura, es un motivo más para atenuar la dependencia del uso de agroquímicos.

Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación es evaluar la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos en *Bacillus megaterium* mediante RT-qPCR., por lo que se realizó pruebas de antagonismo de *B. megaterium* frente a *Botrytis* sp. y *Alternaria* sp., para la activación de la expresión de los genes ITUDI y FEND, se cuantificó el nivel de expresión de los genes ITUDI y FEND, mediante la técnica de qPCR, al día 1, 5 y 9 de *Bacillus megaterium* en antagonismo y a las 24, 48, 72 y 120 horas de *Bacillus megaterium* en fermentación líquida. Para así comprobar la hipótesis: El nivel de la expresión génica de FEND e ITUDI en *Bacillus megaterium*, aumenta cuando se encuentra en crecimiento frente a *Botrytis* sp. y *Alternaria* sp. y cuando se encuentra en fermentación.

Capítulo I

1. Marco Conceptual

1.1 Familia *Bacillaceae*

Las bacterias pertenecientes a la familia *Bacillaceae* están clasificadas según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey's, segunda edición, en la sección XIII, como: Phylum Firmicutes, clase III: Bacilli, orden I: Bacillales. A esta familia pertenecen 62 géneros dentro de los cuales se encuentra el género *Bacillus* (Vanegas, 2015).

Las especies de la familia *Bacillaceae* están ampliamente distribuidas en ambientes naturales y se encuentran en hábitats muy variados. Se han detectado en ecosistemas marinos y de agua dulce, en lodos activados, en sistemas humanos y animales y en diversos alimentos (incluidos los alimentos fermentados), recientemente en entornos extremos como sistemas sólidos y líquidos calientes (Mandic-Mulec, Stefanic, & Van-Elsas, 2015).

La familia *Bacillaceae* comprende en su mayoría especies quimioorganotróficas aerobias o facultativamente anaeróbicas con una pared celular grampositiva. La mayoría de los taxones dentro de la familia forman endosporas, lo que la hace la familia más robusta de la tierra (Mandic-Mulec *et al*, 2015).

1.2 Género *Bacillus*

El género *Bacillus* fue propuesto en 1872 por Cohn, quien clasificó su especie tipo, *Bacillus megaterium*, como una especie formadora de esporas aeróbicas organoheterotróficas. Desde su primera descripción, el género *Bacillus* ha sufrido muchos cambios debido a la difícil clasificación de sus miembros (Withman, 2009). Actualmente es el género más grande dentro de la familia *Bacillaceae*, consta de al menos 226 especies (Mandic-Mulec *et al.*, 2015).

En cuanto a su morfología, tiene forma de bastón alargado, son gram positivos y presentan gran número de flagelos, aunque algunas especies son inmóviles. Sus endosporas, son altamente resistentes y pueden soportar grandes temperaturas gracias a su cubierta, por lo que es muy difícil deshacerse de ellas, pueden sobrevivir a la ebullición durante 20 minutos y la mayoría de sus especies son catalasa positiva (Prescott, Harley, Klein, & Gamazo de la Rasilla, 1999).

En cuanto a su hábitat es muy diversa, viven en el suelo o agua, en organismos vivos y en descomposición. Principalmente son aerobios estrictos, aunque algunas especies pueden ser anaerobios facultativos. Sus condiciones óptimas de crecimiento en el laboratorio son 37 °C y pH de 7 (Prescott *et al.*, 1999).

Varias especies de este género son de gran interés humano, tanto por sus especies perjudiciales como beneficiosas; muchas de estas desempeñan funciones fundamentales en la ecología del suelo (es decir, el ciclo de la materia orgánica) y en la estimulación de la salud y el crecimiento de las plantas (por ejemplo, mediante la supresión de patógenos de las plantas y la solubilización de fosfato), otras presentan aplicaciones a nivel industrial y molecular como vectores en la transformación génica (Villarreal *et al.*, 2018).

1.3 Especie *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium es una bacteria formadora de esporas gram positiva, catalasa positiva y aerobia que se encuentra ampliamente distribuida por toda la Tierra, sobre todo en el suelo. Presenta una endospora altamente resistente, lo que le permite tolerar condiciones ambientales extremas. Crecen entre los 10 °C y 48 °C, pero su temperatura óptima es entre 28 °C y 35 °C, antes del desarrollo de *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* era la especie más estudiada y utilizada como modelo dentro del género *Bacillus* (Madigan, Martinko, & Brock, 2006).

A lo largo del tiempo *Bacillus megaterium* se ha convertido en un microorganismo muy importante para diferentes usos en el medio ambiente y la industria, ya que este ayuda a la

descomposición de residuos vegetales produce enzimas para la elaboración de productos químicos, entre otras aplicaciones. En la agricultura es excelente para la fabricación de fertilizantes, evita enfermedades y además ayuda al crecimiento de los cultivos controlando plagas (Gu *et al.*, 2018).

1.3.1 Taxonomía

De acuerdo al Manual de Bacteriología Sistemática de Begey's (Withman, 2009), *B. megaterium* se clasifica taxonómicamente como se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1.

Taxonomía de *Bacillus megaterium*

Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacili
Familia	<i>Bacillaceae</i>
Género	<i>Bacillus</i>

Fuente: (Withman, 2009).

1.3.2 Descripción Morfológica

Como todas las especies de este género, las células de *Bacillus megaterium* tienen forma de barra con bordes redondeados, mide aproximadamente 1,5 µm de ancho por 4 µm de largo. Se encuentran de forma individual o formando pequeñas cadenas; el centro de la célula bacteriana posee una espora esférica, que no modifica la forma de la bacteria. Poseen flagelos que le ayudan a su movilidad y antígenos somáticos, flagelares y de esporas, los antígenos de las esporas son termo resistentes al igual que las propias esporas (Madigan *et al.*, 2006).

Sus colonias morfológicamente son lisas, rugosas, la periferia es extendida en el medio o puede ser ondulada y su tamaño va de 4 a 5 mm de diámetro (Madigan *et al.*, 2006).

Bacillus megaterium presenta un crecimiento sigmoideo, característico de las bacterias, la fase de latencia, la cual es la fase de adaptación al medio dura aproximadamente 4 horas, su fase exponencial de mayor multiplicación bacteriana dura hasta la hora 20 y a partir de ahí entra en fase estacionaria hasta la hora 72, a partir de la cual entra en fase de muerte celular (Collaguazo & Tenorio, 2018).

1.4 *Bacillus megaterium* como controlador biológico

La producción de cultivos agrícolas requiere el uso de un método que proteja a los cultivos de patógenos microbianos, que de otro modo reducirían el rendimiento y la calidad de los cultivos cosechados. La alternativa al uso de productos químicos sintéticos ha sido un área activa de investigación junto con la agricultura orgánica y sostenible. Se están aplicando métodos de protección de plantas más seguros y respetuosos con el medio ambiente; especialmente con enfoques de biocontrol que utilizan microorganismos beneficiosos (Hashem & Allah, 2019).

Al control biológico se lo define como un método para detener el crecimiento y desarrollo de organismos vivos perjudiciales con el objeto de controlarlos. En este sentido el control biológico, que utiliza microorganismos benéficos, es un excelente enfoque para limitar el efecto adverso de otros organismos que causan afecciones a la salud y la productividad de las plantas. Se ha realizado un esfuerzo considerable para identificar agentes de control biológico microbiano que puedan evitar el crecimiento de los fitopatógenos, especialmente aquellos que causan grandes daños y pérdidas económicas considerables (Gadhav, Finch, Gibson, & Gange, 2016).

Las especies de *Bacillus* que se utilizan para aplicaciones de biocontrol producen metabolitos antimicrobianos que pueden utilizarse como sustitutos del uso de productos químicos sintéticos, o como complemento del uso de plaguicidas biológicos y biofertilizantes para controlar las enfermedades de las plantas (Gu *et al.*, 2018). El éxito del control biológico depende de la

selección adecuada de agentes efectivos y de su capacidad para brindar protección contra patógenos específicos en cultivos específicos (Hashem & Allah, 2019).

Una de estas especies es *B. megaterium*, debido a que tiene la capacidad de segregar bacteriocinas, enzimas hidrolíticas y lipopéptidos antimicrobianos. Su capacidad para exhibir la actividad de biocontrolador depende de tres factores: la vulnerabilidad y virulencia del patógeno, así como el entorno de estos factores determinan el éxito o fracaso de sus mecanismos para ejercer su control (Hashem & Allah, 2019).

1.4.1 Lipopéptidos sintetizados por *Bacillus megaterium*

Los microorganismos con potencial controlador biológico generalmente producen uno o más compuestos con actividad antibiótica. Los antibióticos específicos involucrados en la reacción antagónica se activarán secuencialmente en presencia del patógeno, estos compuestos antimicrobianos no necesitan expresarse simultáneamente durante el proceso de biocontrol. Se sabe que varias especies de *Bacillus* utilizan la antibiosis como su principal forma de acción para suprimir la infección por hongos evitando su crecimiento. Se sabe que *Bacillus megaterium*, produce varios lipopéptidos antimicrobianos con un 4-5 % de su genoma y este ha sido el mecanismo de control que mejores resultados ha presentado (Sajitha & Dev, 2016).

La estructura química de los lipopéptidos consta de un núcleo peptídico con un grupo hidrófobo unido por un átomo de nitrógeno en su extremo aminoterminal, el grupo lipídico está formado por un ácido graso lineal o ramificado que puede ser saturado o insaturado. El extremo no polar contiene por un hexapéptido cíclico de aminoácidos con grupos OH (Wang *et al.*, 2015).

Entre los principales grupos de lipopéptidos se encuentran los siguientes:

1.4.1.1 Grupo de Iturinas

Los miembros del grupo iturina son antibióticos lipopeptídicos cíclicos. Se conocen cuatro antibióticos iturínicos (iturinas A, C, D, E). Estos antibióticos se caracterizan por una secuencia de aminoácidos LDDLLDL invariante y una cola hidrófoba variable- β -amino, ácido graso con 14 a 17 átomos de carbono unidos en la posición C³ en un péptido cíclico a través de un enlace β -péptido. Las diferencias entre iturina A, iturina D e iturina E son: un residuo de Asn o Gln en iturina A se reemplaza por un residuo de Asp o Glu en iturina D, pero por un Asp-OCH₃ o Glu-OH en iturina E, respectivamente. En comparación con la iturina A, la iturina C no tiene actividad antibiótica (Tsuey *et al.*, 2005).

Las Iturinas muestran fuertes efectos inhibitorios *in vitro* en una amplia gama de hongos como las levaduras (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019), pero son menos activos contra las bacterias y no poseen actividad antiviral (Kumar *et al.*, 2012). El espectro antifúngico, la baja toxicidad y los efectos alergénicos hacen que las iturinas sean medicamentos valiosos y prometedores agentes de control biológico a largo plazo y sus estructuras los hacen más biodegradables que otros agentes químicos (Wang *et al.*, 2015).

1.4.1.2 Grupo de Fengicinas

Las Fengicinas son decapeptidos cíclicos. Una cadena de ácido graso β -hidroxi está unida a los otros dos aminoácidos. La configuración de la secuencia de aminoácidos es LDLDLDDL, con un enlace de lactona que conecta l-Tyr a l-Ile. Esta clase de lipopéptidos incluye fengicinas A y B y homólogos relevantes, que difieren en el aminoácido en la posición 6 del resto peptídico (d-Ala para fengicina A y d-Val para fengicina B) y la longitud de la cadena de ácido graso (13 a 17 átomos de carbono). Las fengicinas son anillos de macrolactona, en los que la cadena lateral de Tyr en la posición 3 de la secuencia peptídica forma un enlace éster con el residuo C-terminal, produciendo un anillo interno (Tsuey *et al.*, 2005).

Las fengicinas son menos hemolíticas que las iturinas y tienen una fuerte actividad antifúngica, específicamente contra los hongos filamentosos. Las fengicinas y las cepas que las producen son útiles para proteger las plantas contra patógenos fúngicos, como *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium irregulare*, *Cladosporium fulvum* y *Botrytis cinerea* hongos fitopatógenos responsables de graves pérdidas agrícolas. Al igual que otros lipopéptidos, las fengicinas actúan de manera sinérgica haciéndolas más efectivas, cuando se usan juntas la iturina y la fengicina (Wei, Ruey, & Yu, 2015).

1.4.1.3 Grupo de Surfactinas y compuestos relacionados

La familia de lipopéptidos más estudiada son las surfactinas. Esta familia contiene 20 lipopéptidos diferentes, como esperina, liquenisina, pumilacidina y surfactinas. El grupo surfactina son heptapéptidos cíclicos con una configuración quiral LLDLLDL que forma una estructura de anillo de lactona cíclica unida a una cola de ácido graso β -hidroxi con 13-15 átomos de carbono. Estudios recientes demostraron que las surfactinas son una mezcla de peptidolípidos que difieren en la homología de las porciones de lípidos (Savadogo *et al.*, 2011).

La razón por la que las surfactinas han atraído tanto interés en los últimos años es su excepcional poder surfactante, que disminuye la tensión superficial del agua de $72 \text{ a } 27 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ a una concentración tan baja como $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Estas moléculas poseen nuevas actividades que incluyen emulsificación, espumación, actividad antiviral, anti-micoplasma, anti-fitopatógenos fúngicos, inhibición larvica y enzimática (Wang *et al.*, 2015).

También hay varios antibióticos peptídicos con estructuras especiales y características diferentes en comparación con los antibióticos mencionados anteriormente. Estos incluyen bacilisina, rizotocina, amicoumacina, TL-119, micobacilina y dicetopiperazinas (DKP) que igual presentan actividades antimicrobianas pero con menor efectividad (Parker & Walsh, 2016).

1.4.2 Hongos fitopatógenos sensibles a *Bacillus megaterium*

Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila, poseen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes. La mayoría de las cien mil especies de hongos conocidas son estrictamente saprófitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la cual descomponen. Alrededor de 50 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y casi el mismo número ocasiona enfermedades en los animales y más de 8000 especies de hongos producen enfermedades en una gran variedad de especies de plantas, a estos se los conoce como fitopatógenos (Agrios, 2005).

La mayoría de las plantas en algún momento son atacadas por algún tipo de hongo y estos a su vez atacan a una o diversas especies. Algunos hongos crecen y se reproducen sólo cuando establecen cierta asociación, con las plantas que les sirven de hospedante, durante todo su ciclo de vida, estos hongos se conocen como parásitos obligados o biótrofos. Otros requieren de una planta hospedante durante una cierta etapa de su ciclo de vida, el cual lo pueden concluir desarrollándose en materia orgánica muerta o bien creciendo en plantas vivas (como por ejemplo los parásitos no obligados), lo que ha implicado que los hongos constituyan en un grave problema (Peña & Páex, 2010).

Los hongos frente a los cuales se ha usado *Bacillus megaterium*, que están reportados en la literatura científica son: *Rizhooctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum*, *Colletotrichum panacicola*, *Fusarium semitectum*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichothecium roseum*, *Puccinia striiformis* f. sp. tritici (Pst), *Phytophthora pistaciae*, *Plasmodiophora brassicae*, *Alternaria alternata*, *Botryosphaeria dothidea*, *Rhizopus stolonifer*. Entre estos, los géneros más comunes son *Rizhooctonia*, *Fusarium* y *Rhizopus* (Chen *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2014; Constantinescu, 2017; Huang, Wu, He, Ye, &

Li, 2017; Wang, Wang, Jin, & Zheng, 2013; Yang, Bi, Chen, Ge, & Zhao, 2006; Yang, Wang, Wang, Chen, & Zhou, 2009; Zhao *et al.*, 2013).

1.4.3 *Alternaria* sp.

Alternaria sp. es un hongo dematiáceo, perteneciente al orden Pleosporales, familia *Pleosporaceae*. El género *Alternaria* abarca cientos de especies; la mayoría son saprófitas, encontrándose en el suelo, material en descomposición y aire. Este hongo posee cadenas de conidias de color marrón pálido y en forma de frasco, tienen tabiques transversos y longitudinales (Rivas, 2015).

Este hongo fitopatógeno ataca principalmente a frutales, donde el melón (*Cucumis melo* L.), es uno de los más afectados, así como la uva y la manzana donde ocasiona podredumbre en los frutos. Además, se lo puede encontrar en tomate, trigo, papaya y también puede encontrarse en el aire, polvo y lugares con humedad, causando enfermedades respiratorias en humanos (Zhao *et al.*, 2013).

1.4.4 *Botrytis* sp.

El patógeno *Botrytis* sp. pertenece al orden: Helotiales y a la familia: *Popocacasiaceae*. Este forma un micelio oscuro y conidióforos en conjunto de forma ovoide y unicelular. Este hongo libera esporas en ambientes húmedos y estas son esparcidas por el aire. Algunas especies producen una fase perfecta de esclerotinia, en la que las ascosporas se forman en un apotecio (Peña & Páex, 2010).

Este patógeno presenta actividad en temperaturas bajas, lo que provoca pérdidas significativas en las cosechas que permanecen en cuarentena durante largos periodos, aun cuando las temperaturas oscilan entre 0 y 10 °C (Peña & Páex, 2010).

Botrytis sp. afecta a varios cultivos de hortalizas, frutales y plantas ornamentales. El cultivo de fresa es uno de los principales afectados por *Botrytis* sp., este patógeno causa una de las enfermedades más graves que afectan a frutas, hojas, pecíolos, tallos y flores en climas fríos y húmedos. Además, las esporas conidiales contaminadas durante la cosecha pueden causar una grave pudrición en el almacenamiento del cultivo, especialmente cuando las frutas están mojadas. La enfermedad del moho gris en la fresa ha sido controlada principalmente por fungicidas químicos pero estos tienen altos porcentajes de residualidad en las fresas convirtiéndolo en un cultivo peligroso para el consumo humano (Hang, Oh, Kim, Hur, & Koh, 2015).

1.4.5. Método de evaluación de antagonismo: cultivo dual

Para evidenciar la capacidad antagónica que posee cualquier tipo de microorganismo, por lo general se realizan ensayos *in vitro*, los cuales consisten en enfrentar en un mismo ambiente físico a organismos de interés y someterlos a estrés por competencia de nutrientes y espacio, esperando que con el paso del tiempo uno de los dos tienda a producir metabolitos secundarios con características antibióticas, con el fin de que el otro organismo competidor ceda su crecimiento y de esta manera aprovechar los nutrientes existentes en el medio. Esto suele suceder cuando el microorganismo antagónico llega a su fase estacionaria, donde el estrés es evidente.

Para evaluar si a una bacteria se le puede considerar como controlador biológico contra hongos patógenos, se suele utilizar el cultivo dual, donde se inocula discos de 5 mm de diámetro con el hongo en el medio de la caja Petri y en los cuatro puntos cardinales se realizan 4 estrías de la bacteria, y se incuba en condiciones que favorezcan el crecimiento del hongo. Esta distribución del espacio es adecuada para que cada microorganismo tenga las mismas posibilidades de crecer, hasta estar en contacto y evidenciar que *Bacillus megaterium* pueda o no detener el

crecimiento del hongo ya que esta técnica ha sido realizada por diferentes autores para evaluar la actividad antibiótica en bacterias (DeFilippi, Groulx, Megalla, Mohamed, & Avis, 2018; Zalila-Kolsi *et al.*, 2016). Para estos ensayos por lo general se utiliza medio de agar papa dextrosa (PDA), con el fin de someter a estrés a la bacteria esperando como resultado la producción de antibióticos, que inhiban el crecimiento del hongo (DeFilippi *et al.*, 2018). Así se han realizado estudios similares utilizando *Bacillus* sp. para evaluar la actividad antibiótica, con la singularidad que las variables tomadas en cuenta han sido: la fuente de carbono que puede provenir de un medio para hongos (PDA) o agar nutritivo, además el tiempo que ha sido indispensable, ya que ayuda a entender en que parte de la curva de crecimiento la bacteria comienza a producir dichos metabolitos (Jacob, Bhagwat, & Kelkar-Mane, 2015). Esta técnica de cultivo puede tener varias modificaciones, ya que es válido utilizar diluciones de la bacteria y sembrar en medios sólidos junto con el hongo, de igual manera se espera observar la inhibición, además, el tiempo es crucial en este tipo de ensayos por lo que según otros autores se ha trabajado desde los tres primeros días hasta los diez ya que en este tiempo se puede evidenciar el comportamiento de los microorganismos en prueba (Chen, Wang, Wang, Hu, & Wang, 2010). Es así que se ha evidenciado la actividad antibiótica de algunas especies de *Bacillus* sp., contra distintos hongos patógenos como *Alternaria* sp, *Fusarium* sp, *Aspergillus* sp, entre otros, pues el cultivo dual ha sido muy práctico ya que a partir de este se pueden realizar diferentes estudios como la caracterización molecular y bioquímica de los metabolitos (Jacob *et al.*, 2015).

1.5. Métodos de cuantificación de lipopéptidos

Una vez evidenciada la actividad antibiótica, es importante caracterizar y cuantificar los metabolitos responsables, y la mejor manera de hacerlo es utilizando métodos químicos ya que estos tienen la ventaja de realizarlo utilizando mezclas complejas y simples analizando un solo

tipo de sustancia, y de igual manera existen los métodos moleculares que poseen mayor especificidad a lo que se está trabajando (García, 2016).

1.5.1. Métodos químicos

Estos métodos tienen como función determinar la abundancia de cualquier metabolito presentes en cualquier sustancia líquida; como ejemplo la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una buena opción, ya que ofrece resultados confiables, con clara resolución y para lipopéptidos se ha tratado con inyecciones de extractos metabólicos (Geissler *et al.*, 2017). También existe la cromatografía de capa fina de alta resolución que arroja datos fiables y se los obtiene en un menor tiempo a diferencia del HPLC, esta técnica también ha sido utilizada para la cuantificación de lipopéptidos que han sido productos de la fermentación de algunas cepas de *Bacillus* sp. (Geissler *et al.*, 2017). Así mismo trabaja la cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPCL), a diferencia que se puede analizar una muestra que contiene mezclas complejas de metabolitos (Ndlovu, Rautenbach, Khan, & Khan, 2017) y se puede optar por otro método como trabajar con fluorescencia sensible para la cuantificación de lipopéptidos, el cual consiste en utilizar un tinte fluorescente que permite ser detectado con mejores curvas y con una mejor linealidad (Heuson *et al.*, 2019).

1.5.2. Métodos moleculares

Consiste en evaluar el nivel de expresión génica de cualquier sustancia, pues el cambio en la producción de cada metabolito está influenciado por el estadio en cual se encuentra cada organismo, las necesidades metabólicas para sobrevivir y los agentes externos que afectan el desarrollo del organismo. Además, tanto en eucariotas como en procariotas, se conoce que entre individuos de la misma especie poseen el mismo código genético, eso quiere decir que se comparte la mayoría de genes entre individuos, pero la expresión de cada gen va a ser distinta dependiendo el factor que esté presente y esto sucede porque cada organismo suele someterse

a un mecanismo de adaptación al medio que lo rodea y para evidenciar como los factores bióticos o abióticos afectan a la expresión génica en cada organismo y de cada metabolito, se suele emplear el método de cuantificación por la reacción de la cadena de la polimerasa (qPCR), el cual consiste en interpretar la cantidad de cDNA que se produce a partir de mRNA obtenido, pues no todo el ácido ribonucleico mensajero maduro obtenido, se convertirá en cDNA, ya que depende del estado del organismo para que produzca en mayor cantidad que a su vez se ve afectada la expresión de un gen obteniendo cantidades fuera de lo normal, y para ello se aplica la cuantificación absoluta y relativa para interpretar este tipo de datos (Alberts *et al.*, 2010).

1.6. Expresión génica

La regulación de la expresión génica en cualquier organismo, está dada por la síntesis de proteínas que la mayoría de los casos son enzimas que participan en distintos procesos metabólicos, que su producción está controlada por el requerimiento de la célula, es decir que dependiendo la necesidad en dicho momento particular, la célula activa su maquinaria genética para la síntesis de proteínas, pero estos procesos requieren de un gran gasto de energía la cual puede ser útil para otros procesos y es por esta razón que la expresión génica es un proceso controlado a través del tiempo y las circunstancias por la cual pasa la célula, debido a ello la expresión de los genes aumenta o disminuye, y por ello es importante entender que al hablar de expresión se refiere a la cantidad de mRNA de un gen específico que pasará a ser traducido hasta convertirse en un compuesto activo (Fernández-Piqueras, Fernández-Peralta, & Santos-Hernández, 2000).

1.6.1. Retrotranscripción

Este proceso es crucial para el estudio de la expresión génica ya que, a partir de la extracción de mRNA de tejidos, órganos o células, se obtiene hebras monocatenarias (cDNA), pero hay que entender que el mRNA del cual se parte es un conjunto o una mezcla de genes expresados,

que deben pasar por un proceso de retrotranscripción para obtener las hebras codificantes, las cuales van a ser evaluadas mediante la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR). Este proceso requiere de los cebadores específicos para analizar no solo la presencia sino la cantidad de aquel gen específico que logró ser expresado y esto se lo realiza por el método de RT-qPCR, que sirve para interpretar el nivel de la expresión génica de cada gen de interés (Olascoaga & Lopez, 2012).

1.6.2. Cuantificación de la expresión génica mediante PCR tiempo real

Primero se debe tener claro que PCR en tiempo real es la interpretación de las señales fluorescentes que son emitidas durante la reacción de la cadena de la polimerasa a través de una serie de ciclos, y que la variación de la señal fluorescente en cada ciclo es el dato que se interpreta, por lo tanto la RT-qPCR analiza la señal fluorescente en un valor medible por cada reacción y para cada muestra analizada (Schmittgen, 2006).

1.6.2.1. Cuantificación absoluta

Está claro que la RT-qPCR es una variante de la PCR convencional, ya que ésta aparte de amplificar también cuantifica el amplicón de manera absoluta, es decir que determina el número de copias que se generan como resultado de la reacción de la cadena de la polimerasa (Solera del Río, 2014). Para una cuantificación absoluta es necesario conocer las cantidades específicas de los genes estándares porque estos datos servirán para relacionar entre la muestra y la curva estándar previamente realizada y así determinar la concentración de número de copias que se encuentran presentes en cada muestra (Schmittgen, 2006).

1.6.2.2. Cuantificación relativa

La cuantificación relativa consiste en interpretar la cantidad en la que se expresa un gen específico normalizado frente a un control endógeno. Estos controles se los denomina como

genes de mantenimiento o house-keeping y poseen la característica de expresarse en cualquier circunstancia del organismo, es decir que puede mantener una expresión constante (Schmittgen, 2006).

En la cuantificación relativa no se necesita de una curva estándar, pero si es un requisito conocer la secuencia del gen de referencia, pero las unidades son irrelevantes en la cuantificación porque lo único que se pretende en las investigaciones es entender los cambios fisiológicos o metabólicos a nivel de expresión génica. Esto quiere decir que se interpreta que un gen aumentó o disminuyó su expresión en relación a un gen que mantiene su expresión normal (Schmittgen, 2006).

Por tanto, para determinar se mide la diferencia entre el ciclo umbral (C_p), pero la relación de los datos debe pasar por un proceso de normalización, que consiste en controlar el error experimental, y de esta manera se garantiza el rendimiento de los ciclos al pasar por PCR. Parte de la normalización consiste en cumplir con algunas variables como: masa de la muestra, cantidad de ARN obtenido, cantidad de DNA retrotranscrito, RNAm de referencia, entre otros (Schmittgen, 2006).

Capítulo II

2. Marco Metodológico

2.1. Localización del estudio

El presente trabajo fue realizado en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana campus el Girón, en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular.

2.2. Pruebas de antagonismo: cultivo dual

Para realizar las pruebas se trabajó con las cepas de *Bacillus megaterium* (CT-11), *Botrytis* sp. (Bo) y *Alternaria* sp. (Al), las cuales eran parte del cepario perteneciente al proyecto de investigación “Evaluación de la capacidad de cepas de *Bacillus* sp. como microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR) en hortalizas” dirigido por el M.Sc. Daniel Acurio, parte del Grupo de Investigación BIOARN.

2.2.1. Preparación de los inóculos

Cada cepa se mantenía en crioconservación a -80 °C, por lo que fue necesario reactivarlas por separado y para ello se realizó medios de cultivo agar nutritivo que favorece el crecimiento de bacterias, en este caso para *Bacillus megaterium*, pues para este medio se diluyó 22 gramos de agar en 1 litro de agua destilada, concentración necesaria para proveer de nutrientes a la bacteria y su reactivación se óptima. La bacteria se sembró en este medio e incubó a 36 °C.

De igual manera tanto para *Botrytis* sp. como para *Alternaria* sp. se utilizó el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) que es específico para el crecimiento de hongos. Se sembró en el medio e incubó a 26 °C.

2.2.2. Cultivo dual: *B. megaterium* frente *Alternaria* sp. y *Botrytis* sp.

Para realizar las pruebas de antagonismos se trabajó a partir de los microorganismos ya reactivados, se utilizó el método de cultivo dual para comprobar la actividad inhibitoria de *Bacillus megaterium* contra *Botrytis* sp y *Alternaria* sp. para esto se inoculó en medio PDA en el centro de la caja Petri al hongo, y se realizó una estría con la bacteria en un extremo de la placa. Una vez realizada las siembras, se incubó por 9 días a 36 °C, favoreciendo el crecimiento del hongo y estresando a la bacteria (DeFilippi, Groulx, Megalla, Mohamed, & Avis, 2018; Zalila-Kolsi *et al.*, 2016).

Para cuantificar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial se realizaron mediciones del radio de crecimiento de los hongos al día 1, 5 y 9 de incubación y de los testigos que son los hongos sin el biocontrolador. Se aplicó la fórmula utilizada por Suárez *et al.* (2008):

$$PICR = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

2.3. Fermentación líquida

2.3.1. Preparación del inóculo

Para la reactivación de las cepas se realizaron siembras por estrías de la cepa crioconservada de *B. megaterium* en cajas Petri con Agar Nutritivo, se incubó por 24h a 35 °C. A continuación, se realizó una suspensión bacteriana, transfiriendo biomasa fresca en una solución salina normal, hasta llegar a una concentración de $10^5 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ mediante comparación con el estándar 0,5 de la Escala Mc Farland.

2.3.2. Fermentación

La fermentación líquida para el crecimiento de *Bacillus megaterium* y producción de lipopéptidos antimicrobianos se realizó en medio de cultivo comercial TSB (Trypticase Soja

Broth), donde cada unidad experimental constó de un matraz Erlenmeyer de vidrio de 250 mL de capacidad, el cual contenía 100 mL del medio inoculado con la suspensión bacteriana (10^5 UFC \cdot mL⁻¹) de *B. megaterium* obtenida previamente, se incubaron a 25 °C, con agitación de 100 rpm por 72 horas.

2.4. Extracción de ARN

2.4.1. Extracción de ARN de *Bacillus megaterium* proveniente del cultivo dual

La extracción de ARN se realizó al día 1, 5 y 9 de crecimiento de *Bacillus megaterium* en antagonismo: cultivo dual frente a *Botrytis* sp. y *Alternaria* sp.

Para realizar la extracción de ARN se utilizó el kit Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Scientific), bajo cámara de flujo laminar previamente desinfectada con savlón, alcohol al 70 % y UV por 15 minutos.

En un tubo falcon se preparó el Buffer de Lysis con concentración de 1 % de 2-mercaptoetanol, para el cual se adicionó 10 μ L de 2-mercaptoetanol por cada 1000 μ L del Buffer de Lysis del kit. En un tubo Eppendorf de 1,5 mL se adicionó 1000 μ L del Buffer de Lysis previamente preparado, se procedió a adicionar la biomasa bacteriana proveniente del antagonismo en cultivo dual y se llevó la preparación al vórtex por 1 minuto para homogenizar la mezcla, seguido de una centrifugación a 12000 x g por 2 minutos, para obtener la sedimentación de la muestra, se pasó 1000 μ L del sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo y se colocó 500 μ L de etanol al 70 % y se llevó al vórtex hasta obtener una homogenización.

Se pasó 700 μ L a un tubo de columna y se llevó la centrífuga por 15s a 12000 x g, se descartó el líquido y se repitió este paso por cuádruplicado.

A continuación, se adicionó 700 µL de Wash Buffer I y se centrifugó por 15s a 12000 x g, se descartó el líquido, se adicionó 700 µL de Wash Buffer II y se llevó a la centrifuga por 15s a 12000 x g, este procedimiento se realizó por duplicado y se descartó el líquido.

La columna se colocó en un tubo de recuperación, se adicionó 50 µL de agua libre de ARNasas para la elución del ARN y se adicionó 1 µL del protector inhibidor de ARNasas (Roche) para evitar la degradación del ARN extraído.

2.4.2. Extracción de ARN de *Bacillus megaterium* proveniente de la fermentación líquida

La extracción de ARN se realizó a las 24, 48 y 72 horas de crecimiento de *Bacillus megaterium* en fermentación.

La extracción del ARN siguió la misma metodología que en el punto anterior, con la diferencia que en un tubo eppendorf se adicionó 1000 µL de suspensión bacteriana y se llevó a centrifugación por 5 min a 5000 x g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 600 µL de buffer de Lysis con 1 % de 2-mercaptoetanol.

2.4.3 Cuantificación de ARN

La cuantificación de ARN proveniente de las extracciones anteriores, se realizó en el Qubit® 2.0 Fluorometer, para el cual se utilizó el Kit Qubit® RNA BR Assay (Life) que se prepara de la siguiente manera: Inicialmente se preparó la “working solution” en un tubo eppendorf de 1,5 mL que contiene 199 µL del Buffer del Kit por cada muestra a cuantificar y 1 µL del reactivo fluorescente por cada muestra a cuantificar, para los estándares se adicionó en un tubo para Qubit 190 µL de la “working solution” y 10 µL del estándar # 1 que corresponde al punto inicial de la curva y en otro tubo se adiciona 190 µL de la “working solution” y 10 µL del estándar # 2 que corresponde al punto final de curva.

Posteriormente se prepararon las muestras en un tubo de Qubit, se adicionó 190 μL de la “working solution” y 10 μL de las muestras a cuantificar de ARN, luego se realizó la lectura en el programa RNA BR, se seleccionó en volumen de muestra 10 μL y el resultado de la cuantificación se seleccionó en unidades de $\mu\text{g} / \mu\text{L}$.

Las muestras de ARN se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización en la transcripción inversa.

2.5. Transcripción inversa

Para obtener cDNA a partir del ARN previamente extraído de *Bacillus megaterium* en antagonismo frente a *Botrytis* sp. y *Alternaria* sp. y en fermentación líquida a diferentes tiempos, se utilizó el kit Superscript® III First-Strand Synthesis Supermix for RT-qPCR (Invitrogen).

Primero se colocó en un tubo eppendorf los siguientes componentes del kit: 10 μL del 2X RT Reaction Mix, 2 μL de RT Enzyme Mix, 5 μL de ARN el cual debe estar a concentración de 5 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ y se completó a 20 μL con el DEPC-treated water, se mezcló suavemente el contenido del tubo y se procedió a incubar a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, se terminó la reacción a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos y se enfrió a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente se adicionó 1 μL de *E. coli* RNase H y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos, las incubaciones se realizaron en el equipo 4484073 ProFlex™ (Thermo Scientific).

El cDNA obtenido se lo cuantificó en el equipo Qubit® 2.0 Fluorometer, utilizando el kit Qubit™ ssDNA Assay, inicialmente se corrieron los estándares para obtener la curva de calibración siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se prepararon las muestras en un tubo para Qubit, se adicionó 190 μL de la “working solution” y 10 μL de las muestras a cuantificar de cDNA, posteriormente se realizó la lectura en el

programa ssDNA, se seleccionó en volumen de muestra 10 µL y el resultado de la cuantificación se seleccionó en unidades de ng / µL. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su posterior utilización en la RT-qPCR.

2.7. Cuantificación relativa mediante RT-qPCR

2.7.1. Selección de primers

Los primers fueron seleccionados a partir de bibliografía, los cuales son los siguientes: para el gen ITUDI son F: 5' GATGCGATCTCCTTGGATGT 3', R: 5' ATCGTCATGTGCTGCTTGAG 3' y para el gen FEND son F 5' TTTGGCAGCAGGAGAAGTT, R: 5' GCTGTCCGTTCTGCTTTTTC 3'.

2.7.2 Amplificación: PCR tiempo real

La amplificación del cDNA previamente obtenido, se realizó en el equipo LightCycler® 2.0 (Roche), antes de realizar la corrida, el equipo requiere un “Self test” para trabajar en óptimas condiciones.

Las amplificaciones se realizaron para los genes de FEND, ITUDI y para el gen constitutivo 16S (empleado para normalizar los datos en la cuantificación relativa) y para los controles negativos de cada par de primers. La amplificación de cada gen se realizó por triplicado.

En un tubo eppendorf de 500 µL se adicionó 10 µL del reactivo Fast Sybr™ Green Master Mix. Biosystems™, 1 µL del forward primer, 1 µL de reverse primer, 5 µL de la muestra de cDNA y se completó el volumen a 20 µL adicionando 3 µL de agua (PCR grade), para los controles negativos se adicionó 8 µL de agua en lugar de la muestra, se adicionó la mezcla en los capilares y se procedió a llevarlos a centrifugación cuidadosamente a 1200 x g por 2 minutos, para asegurar que la muestra esté en el fondo de los mismos.

A continuación, se procedió a colocar los capilares en el carrusel del equipo y se realizó la siguiente programación: Para la desnaturalización inicial se programó la temperatura target a 95 °C, por 1 ciclo. Se procedió al ciclado el cual consta de 45 ciclos con tres temperaturas target 95 °C, 60 °C y 72 °C. A continuación, se pasó al programa Melting de 1 ciclo, con tres temperaturas target 95 °C, 65 °C y 95 °C. Finalmente se programó el enfriamiento de 1 ciclo a 4 °C.

2.7.3. Cuantificación relativa

Para realizar la cuantificación del nivel de expresión de los genes de FEND e ITUDI, se necesita conocer la concentración teórica de partida molecular de cada gen (N_0) y las eficiencias de amplificación (E) para cada reacción para lo cual se utilizó el software LinRegPCR versión 11.0 (Ramakers, Ruijter, Lekanne Deprez, & Moorman, 2003), basado en el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001; Morales, 2019).

Posteriormente se normalizaron los datos con el gen de referencia (16S) empleando la siguiente fórmula (Evrard, Boulle, & Lutfalla, 2010):

$$N_0 \text{ (normalizado)} = \frac{N_0 \text{ gen problema}}{N_0 \text{ gen normalizador}}$$

Los niveles de expresión para cada condición de crecimiento, también se calcularon en una proporción con la condición de control solo (cultivo de *Bacillus megaterium*), mediante la siguiente fórmula (Evrard, Boulle, & Lutfalla, 2010):

$$\text{Nivel de expresión relativa} = \frac{N_0 \text{ gen problema día } n}{N_0 \text{ gen problema día } 1}$$

2.8. Análisis estadístico

2.8.1. Factor de estudio

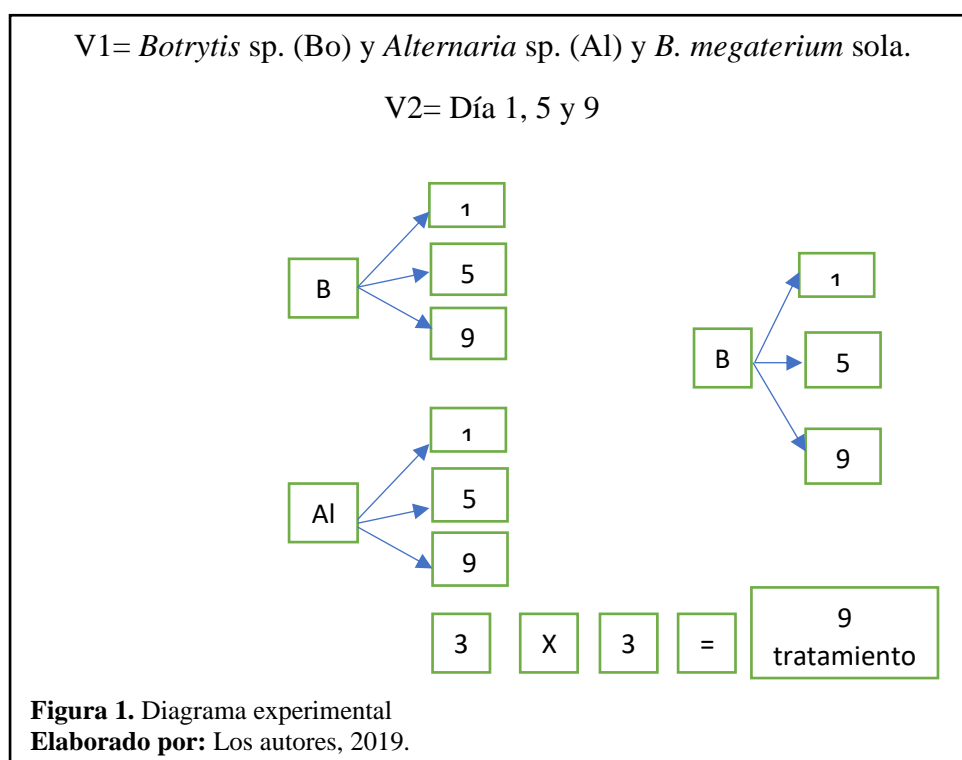
En este caso se toma en cuenta dos variables para la evaluación del estudio, que son:

Variable dependiente: Nivel de la expresión génica de lipopéptidos en *Bacillus megaterium*.

Variable independiente: Crecimiento de *B. megaterium* con *Botrytis* sp. y *Alternaria* sp. incubada al 1, 5 y 9 días y crecimiento de *B. megaterium* en fermentación al día 1, 2, 3 y 5.

2.8.2. Diseño experimental

Puesto que el trabajo involucra dos variables que son: el crecimiento de la bacteria contra dos diferentes hongos y su comportamiento en tres diferentes días, el análisis estadístico que se empleó es un diseño factorial "3*3" y para que los datos sean más objetivos y confiables con respecto a la expresión génica, se utilizó tres repeticiones por tratamiento. El siguiente diagrama explica el diseño experimental usado:



Por lo tanto, se trabaja con nueve tratamientos y cada uno tiene tres repeticiones por lo cual en la Tabla 2 se muestra la conformación de cada tratamiento:

Tabla 2.

Conformación de los tratamientos

Nombre	Variables Crecimiento	Variable días
Ts1	<i>B. megaterium</i>	1
Ts2	<i>B. megaterium</i>	5
Ts3	<i>B. megaterium</i>	9
T1	<i>B. megaterium</i> + <i>Botrytis</i> sp.	1
T2	<i>B. megaterium</i> + <i>Botrytis</i> sp.	5
T3	<i>B. megaterium</i> + <i>Botrytis</i> sp.	9
T4	<i>B. megaterium</i> + <i>Alternaria</i> sp.	1
T5	<i>B. megaterium</i> + <i>Alternaria</i> sp.	5
T6	<i>B. megaterium</i> + <i>Alternaria</i> sp.	9
Total	9 tratamientos * 3 repeticiones = 27 unidades experimentales	

Elaborado por: Los autores, 2019.

Por eso el diseño factorial encaja con el presente estudio, ya que el interés recae sobre el efecto de cada variable independiente, es decir, como influye el nivel de la expresión génica frente al crecimiento de *Botrytis* sp. y *Alternaria* sp., además si el tiempo involucra un cambio en el nivel de la expresión génica. Entonces como el sujeto que en este caso es *Bacillus megaterium* pasa por todas las combinaciones de estudio, el diseño factorial realiza la medición de cada variable y determina la diferencia que existe entre cada uno.

Pero como en todo análisis estadístico es necesario comparar los resultados con un testigo, y en este caso, *Bacillus megaterium* será el blanco en crecimiento con óptimas condiciones, sin niveles de estrés y sometida a fermentación por 3 tiempos distintos (24h, 48h, 72h), pues lo

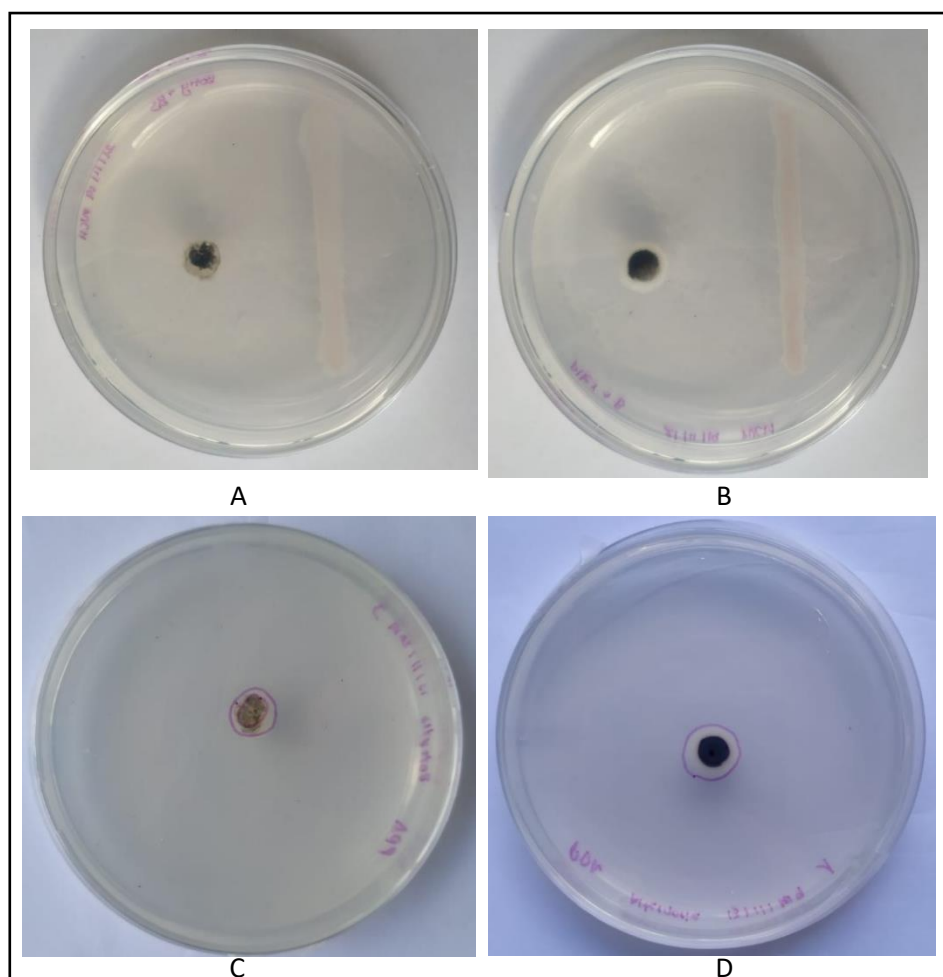
importante de este ensayo es medir el nivel de expresión génica de lipopéptidos de la bacteria sin ningún tipo de estrés biótico o abiótico y para ello se analiza los resultados con el análisis de varianza ANOVA, que ayuda a discriminar como influyen los factores estudiados con la variable respuesta y posteriormente se aplicó la prueba Post Hoc de Tukey al 5 % en el software estadístico Infostat (2018).

Capítulo III

3. Resultados y Discusión

3.1 Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial

Al día uno de incubación el cultivo dual de *Bacillus megaterium* frente *Botrytis* sp. presenta en promedio un crecimiento de $1,00 \pm 0,00$ mm y *Botrytis* sp. solo en crecimiento presenta en promedio $1,04 \pm 0,05$ mm; el cultivo dual de *Bacillus megaterium* frente *Alternaria* sp. presenta en promedio un crecimiento de $1,40 \pm 0,55$ mm y *Alternaria* sp. solo en crecimiento $2,60 \pm 0,55$ mm, como se puede observar en la figura 2.

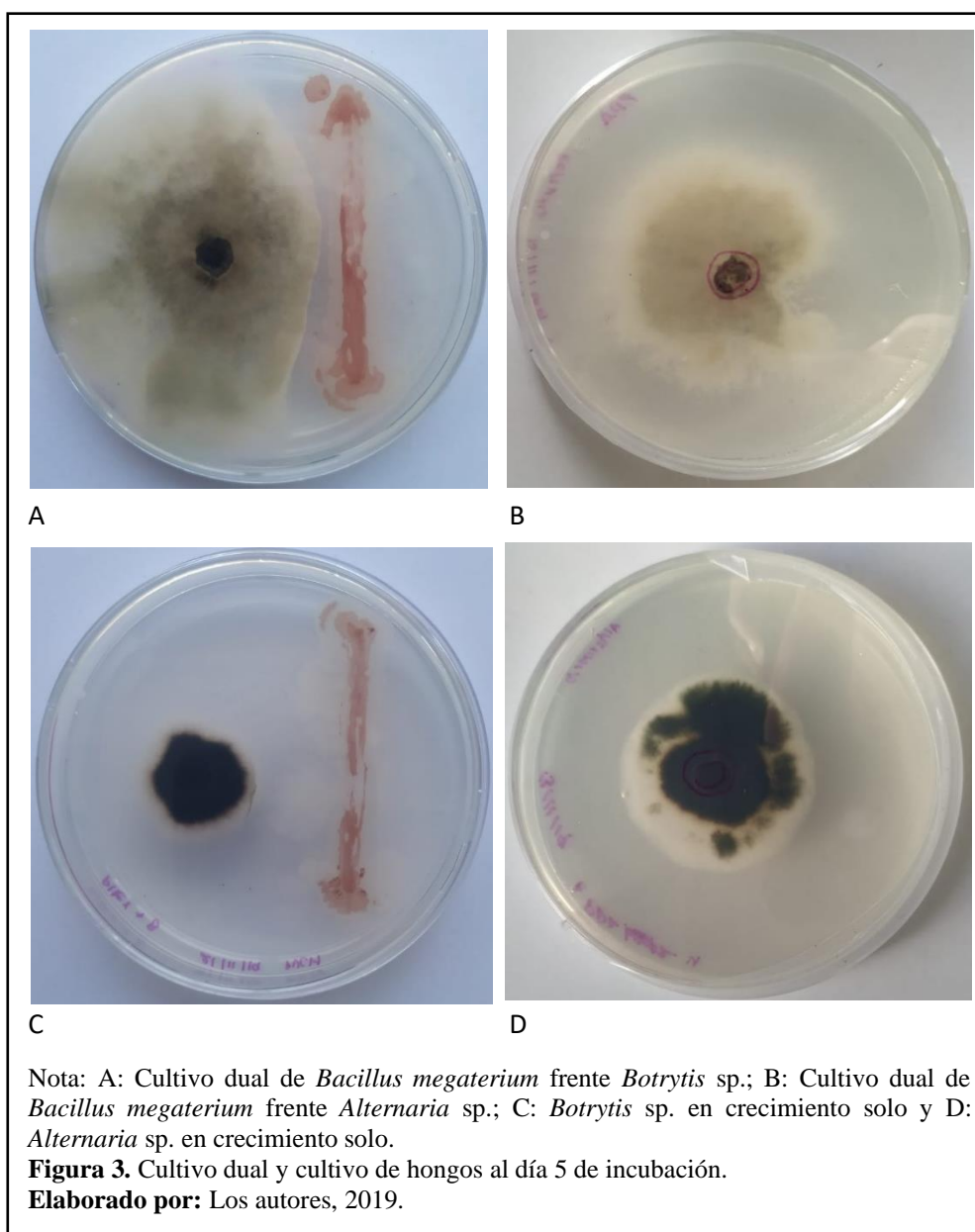


Nota: A: Cultivo dual de *Bacillus megaterium* frente *Botrytis* sp.; B: Cultivo dual de *Bacillus megaterium* frente *Alternaria* sp.; C: *Botrytis* sp. en crecimiento solo y D: *Alternaria* sp. en crecimiento solo.

Figura 2. Cultivo dual y cultivo de hongos al día 1 de incubación.

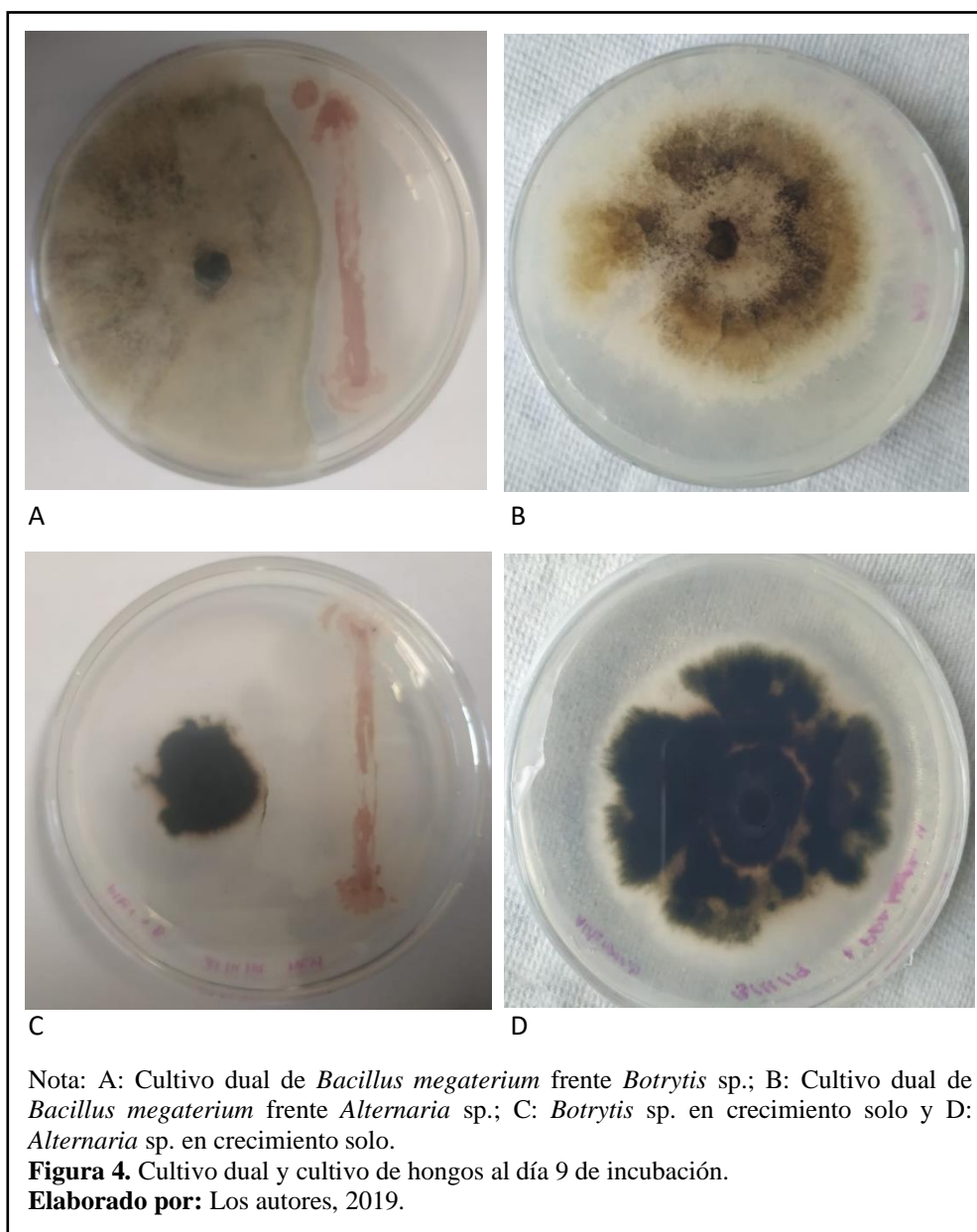
Elaborado por: Los autores, 2019.

Al día cinco de incubación el cultivo dual de *Bacillus megaterium* frente *Botrytis* sp. presenta en promedio un crecimiento de $25,20 \pm 2,7$ mm y *Botrytis* sp. solo en crecimiento presenta en promedio $27,80 \pm 0,45$ mm; el cultivo dual de *Bacillus megaterium* frente *Alternaria* sp. presenta en promedio un crecimiento de $6,11 \pm 1,41$ mm y *Alternaria* sp. solo en crecimiento $25,60 \pm 2,70$ mm, como se puede observar en la figura 3.



Al día nueve de incubación el cultivo dual de *Bacillus megaterium* frente *Botrytis* sp. presenta en promedio un crecimiento de $28,00 \pm 0,00$ mm y *Botrytis* sp. solo en crecimiento presenta en

promedio $40,44 \pm 0,89$ mm; el cultivo dual de *Bacillus megaterium* frente *Alternaria* sp. presenta en promedio un crecimiento de $0,06 \pm 0,09$ mm y *Alternaria* sp. solo en crecimiento $28,80 \pm 4,66$ mm, como se puede observar en la figura 4.



Los porcentajes de inhibición de crecimiento radial ejercido por *Bacillus megaterium* contra *Alternaria* sp. y *Botrytis* sp. al día 1, 5 y 9 son los siguientes:

Tabla 3.

Porcentaje de Inhibición de crecimiento radial

Crecimiento	Día	PICR %
<i>B. megaterium</i> frente	1	43,33 \pm 5,62
<i>Alternaria</i> sp.	5	76,45 \pm 5,22
	9	98,48 \pm 2,14
<i>B. megaterium</i> frente	1	4,55 \pm 5,25
<i>Botrytis</i> sp.	5	10,71 \pm 0,00
	9	30,00 \pm 0,00

Nota: PICR: Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial.

Elaborado por: Los autores, 2019.

En la Tabla 3 se puede evidenciar que existe un aumento en el porcentaje de inhibición conforme transcurren los días de incubación tanto para *Botrytis* sp., como para *Alternaria* sp. y que los porcentajes de inhibición son diferentes para los dos hongos fitopatógenos.

En cuanto al análisis de varianza que se presenta en la Tabla 4, se evidencia que existe diferencia altamente significativa para la variable crecimiento, obteniéndose un p valor $< 0,0001$; de igual manera para la variable días se evidencia diferencia altamente significativa con un p valor de $< 0,0001$ y para la interacción de las variables crecimiento y días se presenta diferencia significativa con un p valor de 0,0395; por lo que se puede interpretar que el porcentaje de inhibición que ejerce *Bacillus megaterium* es diferente para cada hongo y este también varía conforme pasan los días en incubación.

Tabla 4.

Análisis de varianza para la variable porcentaje de inhibición de crecimiento radial para *Bacillus megaterium* frente a *Botrytis* sp. y *Alternaria* sp. a los diferentes días de incubación y la interacción de ambas variables.

FV	SC	GL	CM	F	p - valor
Crecimiento	22172,96	1	22172,96	140,19	<0,0001
Días	7220,62	2	3610,31	22,83	<0,0001
Crecimiento*Días	1196,80	2	598,40	3,78	0,0395
Error	3321,38	21	158,16		
Total	34611,25	26			

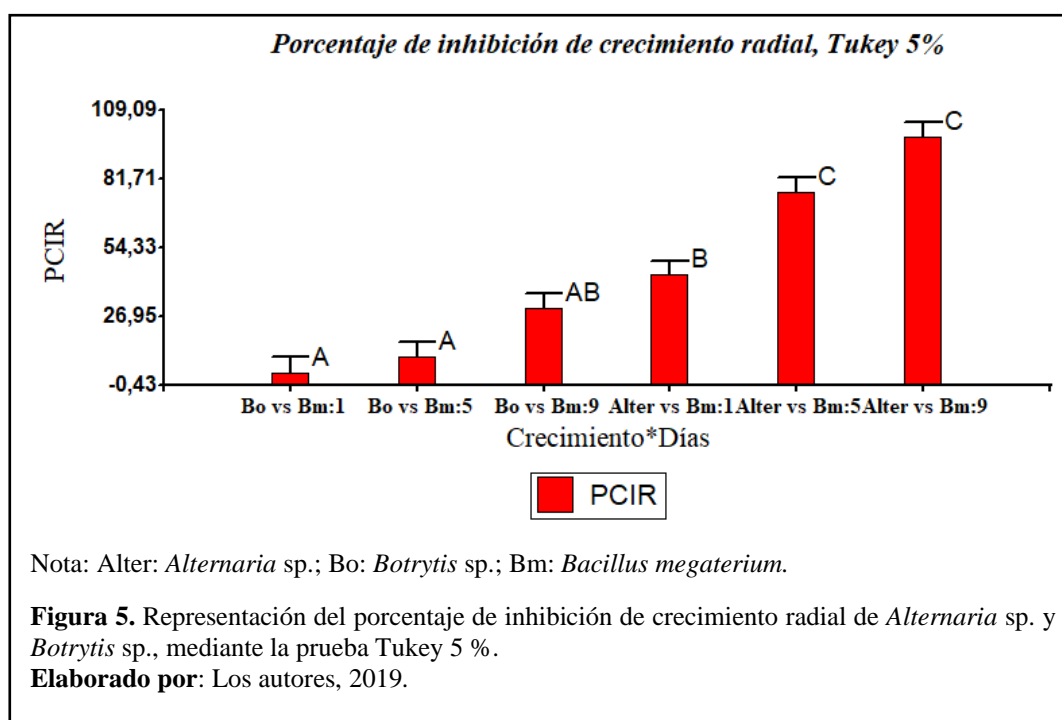
Nota: SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: Los autores, 2019.

En la figura 5 se presentan tres rangos de significancia (A), (B) y (C) al aplicar la prueba Post Hoc de Tukey al 5 %. En el rango A se encuentran los cultivos de *Botrytis* sp. frente *B. megaterium* al día 1, 5 y 9 de incubación los cuales presentan un promedio de porcentaje de inhibición de 4,75 %, 10,71 % y 30 % respectivamente, estos tratamientos no presentan diferencia entre sí y presentan los promedios más bajos de inhibición. En el rango B se encuentra de nuevo el cultivo de *Botrytis* sp. frente *B. megaterium* al día 9 de incubación más el cultivo de *Alternaria* sp. frente *B. megaterium* al día 1 de incubación con un promedio de porcentaje de inhibición de 43,33 % y en el rango C se encuentran los cultivos de *Alternaria* sp. frente *B. megaterium* el día 5 y 9 de incubación con un promedio de porcentaje de inhibición de 76,45 % y 98,48 % respectivamente, siendo estos cultivos los que presentan un mayor porcentaje de inhibición.

Estos resultados nos indican que *Bacillus megaterium* presenta mayor porcentaje de inhibición frente a *Alternaria* sp. llegando casi al 100 % y frente a *Botrytis* sp. el potencial controlador es menor con un porcentaje de inhibición máximo del 30 %.

En cuanto a los días de incubación, estos también influyen en el potencial de inhibición que *Bacillus megaterium* ejerce frente a los hongos, se puede decir que con forme pasan los días en incubación el potencial controlador de *Bacillus megaterium* aumenta.



Según los datos obtenidos, se puede decir que la actividad biocontroladora de *B. megaterium* contra el crecimiento micelial de los hongos patógenos, dependerá mucho del transcurso del tiempo, pues en contraste con los resultados, a partir del día 5, tanto para *Botrytis* sp., como para *Alternaria* sp., la inhibición es evidente, dando los mejores resultados al día 9, pues este suceso es similar al estudio presentado por Kurniawan *et al.* (2018) y Saravanakumar *et al* (2019), que han obtenido porcentajes de inhibición al menos para *Alternaria* sp., frente a *Bacillus megaterium*, que rodean del 11 al 31 % en adelante, pero para muchas especies del género *Bacillus*, es fácil alcanzar porcentajes de inhibición contra los dos patógenos llegando hasta un promedio de 26 a 42 % en adelante, pero con la diferencia que ha sido datos tomados solo al quinto día, como lo reportan Hang, Oh, Kim, Hur, & Koh (2005) donde *Bacillus subtilis* produce una inhibición de hasta el 60 % para *Botrytis* sp. y frente a *Alternaria* sp. una inhibición de hasta un 80 %. Esto llama aún más la atención, ya que, respecto a los resultados obtenidos,

para la variable crecimiento no hay diferencia significativa en cuanto a la inhibición, pero la publicación de García (2016), y Kurniawan *et al.* (2018), concuerdan que tanto especies del género *Bacillus*, como *B. megaterium* puede ser más eficaz si está en crecimiento con algún tipo de patógeno distinto, y para respaldar este suceso, fue necesario compararlo con los datos obtenidos a partir de la expresión génica, que de esta manera se puede asegurar si *Bacillus megaterium*, puede modificar la expresión de genes biocontroladores (ITUI, FEND), cuando está en crecimiento frente a distintos patógenos, o solo es cuestión de tiempo como se observó en el cultivo dual.

3.2 Expresión del gen FEND en *Bacillus megaterium* en crecimiento en placa

En el análisis de expresión génica de FEND en *Bacillus megaterium* mediante RT-qPCR, se monitoreó los niveles de transcritos al día 1, 5 y 9 de antagonismo frente a *Alternaria* sp. y *Botrytis* sp. y en crecimiento solo, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5.

Variación de la expresión génica relativa (EGR) del gen FEND en *Bacillus megaterium* solo y en antagonismo.

Crecimiento	Días de incubación	Promedio de la variación de la EGR (Lineal)	Promedio del cambio de la EGR (Log2)
<i>Bacillus</i>	1	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>megaterium</i>	5	0,56 ± 0,29	-0,97 ± 0,78
	9	0,53 ± 0,35	-1,31 ± 1,49
<i>Bacillus</i>	1	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>megaterium</i> frente	5	20,16 ± 0,18	4,33 ± 0,02
<i>Alternaria</i> sp.	9	2,55 ± 0,47	1,34 ± 0,27
<i>Bacillus</i>	1	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>megaterium</i> frente	5	0,32 ± 0,06	-1,66 ± 0,27
<i>Botrytis</i> sp.	9	0,04 ± 0,01	-4,89 ± 0,60

Elaborado por: Los autores, 2019.

Se puede evidenciar que cuando *B. megaterium* crece sin presencia de hongos patógenos, no se presenta un aumento en la expresión génica con el paso de los días y ocurre lo mismo cuando *Bacillus megaterium* crece frente *Botrytis* sp. como no hay un aumento o disminución del cambio de la expresión relativa en más de 2, cuando esto ocurre no se considera una variación significativa sino un ruido, como lo menciona Lengyel (2018) una fuente inevitable de azar proviene del hecho de que las moléculas que intervienen en la expresión genética (ARN, factores de transcripción, enzimas) se encuentran, a menudo, a bajas concentraciones dentro de la célula, lo que hace que la serie de reacciones enzimáticas que originan proteínas se produzcan de forma aleatoria y en mínimas cantidades debido a una expresión mínima de los genes que las codifican, a este componente se lo ha denominado como “ruido” en expresión genética.

Por otra parte, cuando *Bacillus megaterium* está frente a *Alternaria* sp. al día 5 ocurre un aumento considerable de la expresión del gen.

En cuanto al análisis de varianza que se presenta en la Tabla 6, se evidencia que existe diferencia altamente significativa para las variables crecimiento, días y para la interacción entre ambas obteniéndose un p valor $< 0,0001$, por lo que se puede interpretar que la expresión génica relativa de FEND en *Bacillus megaterium* es diferente frente a cada hongo y también varía de acuerdo a los días de incubación.

Tabla 6.

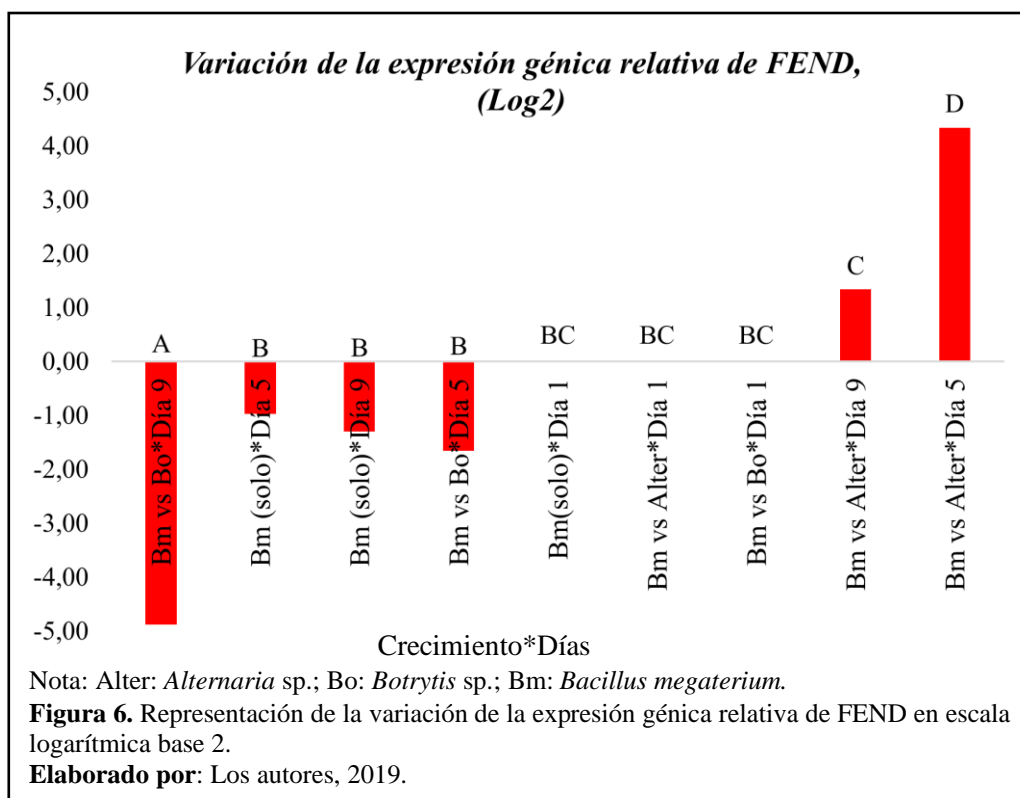
Análisis de varianza para la variable variación de la expresión génica relativa de FEND para *Bacillus megaterium* frente a *Botrytis* sp. y *Alternaria* sp. a los diferentes días de incubación y la interacción de ambas variables.

FV	SC	GL	CM	F	p - valor
Crecimiento	322,84	2	161,42	3148,84	<0,0001
Días	215,57	2	107,78	2102,56	<0,0001
Crecimiento*Días	466,08	4	116,52	2273,00	<0,0001
Error	0,92	18	0,05		
Total	1005,41	26			

Nota: SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: Los autores, 2019.

En la figura 6 se presentan cuatro rangos de significancia (A), (B), (C) y (D) al aplicar la prueba Post Hoc de Tukey al 5 %, en el rango A se encuentra el tratamiento de *Bacillus megaterium* frente a *Botrytis* sp. al día 9 de incubación el cual presenta la menor expresión del gen FEND, en el rango B se encuentran los tratamientos de *Bacillus megaterium* solo en crecimiento al día 5 y 9 de incubación, en el rango C se encuentra el tratamiento de *Bacillus megaterium* frente a *Alternaria* sp al día 9 de incubación, compartiendo el rango BC se encuentran los tratamientos de *Bacillus megaterium* solo en crecimiento y frente a *Botrytis* sp. y *Alternaria* sp. al día 1 de incubación donde se considera la base de la expresión del gen FEND y en el rango de significancia D se encuentra el tratamiento *Bacillus megaterium* frente a *Alternaria* sp al día 5 de incubación, el cual presenta el cambio de expresión mal alto a partir del día 1 de incubación.



Como se puede observar en la figura 6, cuando *Bacillus megaterium* está sólo en crecimiento, no se presenta un aumento significativo en la expresión del gen FEND por el contrario este disminuye con forme pasan los días, es decir en este tratamiento el gen se está down regulando de igual manera ocurre cuando *Bacillus megaterium* se encuentra frente a *Botrytis* sp. en crecimiento.

Por el contrario, cuando *Bacillus megaterium* se encuentra frente a *Alternaria* sp. al día 5 de incubación la expresión del gen FEND aumenta en aproximadamente 20 veces más que en el día 1 (up regulación) y se encuentra en su máxima expresión, en el día 9 de incubación la expresión del gen decae, los cuales son resultados similares a los obtenidos en el estudio realizado por Dragovoz *et al.* (2016) donde se reporta que la variación de la expresión de las diferentes cepas de *Bacillus* frente a *Alternaria alternata* oscila desde 20 a 100 veces más, a partir del día 1.

La expresión de gen FEND aumenta frente al patógeno para el cual es más efectivo el biocontrol, considerándolos como microorganismos diana, lo cual concuerda con lo que Velho *et al.* (2015) presenta en su investigación, ya que afirma que la adición de ciertas bacterias u hongos al crecimiento del biocontrolador puede inducir en mayor medida la producción de los péptidos antimicrobianos específicos para el patógeno frente al cual se están probando, en nuestra investigación *Bacillus megaterium* expresa en mayor medida el gen FEND frente a *Alternaria* sp. deduciéndose que *B. megaterium* es un buen controlador para este hongo fitopatógeno.

Dragovoz *et al.* (2016) en los resultados de su investigación demuestran que en diferentes cepas del género *Bacillus* sp. el lipopéptido que producen en mayor medida son las fengicinas y específicamente el gen que más expresan es FEND, de igual forma Jha, Joshi & Geetha (2016) afirman que el grupo de fengicinas ha sido reportado como inhibidor de crecimiento específico de hongos, mientras que otros lipopéptidos como las surfactinas son específicas para inhibir el crecimiento de bacterias y virus, lo cual concuerda con los resultados presentados, Velho *et al.* (2015) también concuerda con esto ya que la expresión de FENA y FEND en *Bacillus amyloliquefaciens* aumenta hasta 15 veces más a partir de la base de la expresión frente a *Aspergillus* sp. (hongo) pero la expresión es nula frente a *Staphylococcus aureus* (bacteria), frente a esta bacteria se expresan otros genes como: Ipa-14 e ituD.

En un estudio realizado por Knight *et al.* (2018) sobre la expresión de lipopéptidos en *Bacillus subtilis* especie muy cercana a *Bacillus megaterium* demuestra que *B. subtilis* es un gran controlador para *Alternaria* sp. y *Fusarium* sp., también demuestra que a partir del día 3 de incubación se evidencia una mayor expresión del gen FEND, de igual manera Mejía-Bautista, Cristóbal-Alejo, Tun-Suárez & Reyes-Ramírez (2010) afirman que *Bacillus subtilis* inhibe el crecimiento de *Fusarium* sp. y *Alternaria* sp. en ensayos *in vitro* y pudieron detectar la presencia de genes que codifican la síntesis de lipopéptidos como bamC, ituA y sfp responsables

de la síntesis de bacilomicina D, iturina A y surfactina, respectivamente a partir del día 4 de incubación, lo cual concuerda con los resultados obtenidos ya que FEND se expresa en mayor medida específicamente al día 5 de incubación frente a *Alternaria* sp. Considerándose que no existen estudios específicos sobre expresión de genes antimicrobianos de *Bacillus megaterium* y a este empleándose como biocontrolador frente a *Alternaria* sp. y *Botrytis* sp. y esta investigación constituye uno de los primeros acercamientos, se han considerado a discusión estudios similares acerca investigaciones realizadas en especies del género *Bacillus* frente a otros microorganismos patógenos donde evalúan la expresión de varios genes antimicrobianos, no sólo a FEND e ITUD.

3.3 Expresión génica de ITUDI en *Bacillus megaterium* en crecimiento en placa

Respecto al análisis de la expresión génica del gen iturina "ITUDI", por medio del RT-qPCR, evaluado de igual manera, tanto para la variable días, como crecimiento frente a otros patógenos y solo, se muestra en la Tabla 7 los siguientes resultados:

Tabla 7.

Variación de la expresión génica relativa (EGR) de ITUDI en *Bacillus megaterium* solo y en antagonismo.

Crecimiento	Día de incubación	Promedio de la variación de la EGR (Lineal)	Promedio de la variación de la EGR (Log2)
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	5	0,81 ± 0,94	-0,97 ± 1,65
	9	1,22 ± 0,61	-0,17 ± 0,71
<i>Bacillus megaterium</i> frente <i>Alternaria</i> sp	1	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	5	1,73, ± 1,02	0,64 ± 0,78
	9	033, ± 0,08	-1,61 ± 0,36
<i>Bacillus megaterium</i> frente <i>Botrytis</i> sp	1	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	5	3,20 ± 0,64	1,66 ± 0,31
	9	0,10 ± 0,01	-3,31 ± 0,15

Elaborado por: Los autores, 2019.

Para la variable días en *Bacillus megaterium*, la expresión génica no ejerce ningún cambio, pero cuando está en crecimiento con *Botrytis* sp., y *Alternaria* sp., se aprecia una ligera variación al quinto día para ambos casos, presentando el tratamiento contra *Botrytis* sp., el nivel más alto expresando tres veces más que al día uno. Cabe recordar que la efectividad de la respuesta antagónica depende mucho del trabajo en conjunto de varios lipopéptidos más, que cumplen su función específica, para el caso de las iturinas, proveen a la bacteria de actividad antifúngica e inhibitoria, pero Maget, *et al* (1992) y Romero, *et al* (2007) menciona que las fengicinas y surfactinas dependen de la presencia de las iturinas, es así que, aunque sea mínima esta expresión es muy importante tenerla presente para llevar a cabo una eficaz actividad antibiótica.

Respecto a los resultados preliminares de la Tabla 7, fue necesario realizar el análisis de varianza para las variables independientes y de esta manera diferenciar entre la reacción que tiene *Bacillus megateirum* en expresar el gen iturinas en distintas condiciones. Para ello en la Tabla 8 se muestra los resultados:

Tabla 8.

Análisis de varianza para la variable variación de la expresión génica relativa de ITUDI para *Bacillus megaterium* frente a *Botrytis* sp. y *Alternaria* sp. a los diferentes días de incubación y la interacción de ambas variables.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Crecimiento	1,05	2	0,52	1,74	0,2033
Días	8,67	2	4,34	14,43	0,002
Crecimiento * Días	9,78	4	2,45	8,14	0,006
Error	5,41	18	0,30		
Total	24,92	26			

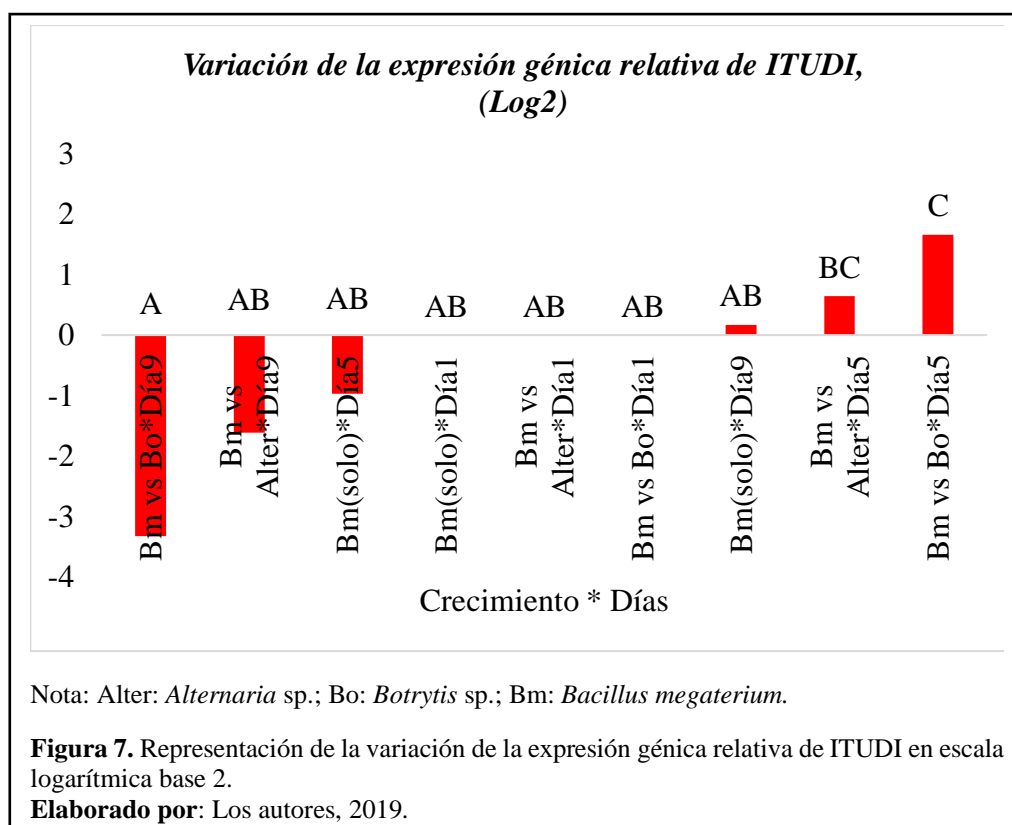
Nota: SC: suma de cuadrados; gl: grados de libertad; CM: media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad

Elaborado: Los autores, 2019.

Para cada variable y su interacción con la prueba de Tukey al 5 %, se obtuvo para crecimiento que no existe diferencia significativa, pero si se analiza la variable días, esta si presenta

diferencia significativa para los tres tiempos de evaluación (días 1, 5, 9) el cual al quinto día se registra 1,91 veces más que el primer día.

En la figura 9 se puede apreciar la interacción entre las variables días y crecimiento, el cual el mejor resultado fue el rango C que conforma *B. megaterium* frente *Botrytis* sp., al día 5 con una media de 3,20 veces más en expresar el gen ITUDI y entre el resto interacciones se puede dividir en dos rangos más, siendo el rango B y A conformado por *B. megaterium*, *B. megaterium* frente *Alternaria* sp., y *Botrytis* sp., al día 1 y 9, con sus medias entre 0,10 y 1,22 respectivamente, que da a entender que en el primer día la expresión de este gen recién empieza, y al noveno día su expresión empieza a decrecer, ya que la cinética de crecimiento de *B. megaterium* menciona tanto Campaña (2018) como Tortoló-Cabañas & Bell-García (2015), que puede alcanzar su fase exponencial desde las 24h hasta pasando las 48h, y su fase de muerte se presenta a las 72h que en relación a nuestros resultados, al noveno día la expresión de este gen notablemente cae. Los datos de la figura 7 han sido representados con logaritmo en base 2 para una mejor ilustración de la expresión génica.



Es evidente que a partir del día 5, la expresión de iturinas cambia ya que, al encontrarse en pleno crecimiento con ambos microorganismos, esto hace que la situación de estrés los obligue a ganar la competencia produciendo metabolitos que inhiban el crecimiento del otro, es por eso que para *Bacillus megaterium*, la expresión génica de iturinas al quinto día aumentara tres veces más al momento de encontrarse con su competidor que en este caso se trató con *Botrytis* sp., pues así lo afirma Juárez (2017) en su estudio que ha evaluado la interacción que existe en la producción de este lipopéptido cuando se enfrenta a especies del género *Bacillus* contra *Botrytis* sp., pues indican que al cabo de 120h el responsable de la inhibición de este patógeno se la atribuye a iturinas, además mencionan que a partir del quinto hasta el séptimo día la producción de iturinas puede ser constante, por lo que no es extraño que entre los resultados de *B. megaterium* frente a los dos patógenos estudiados, se obtuvo que al día 9 la expresión decrece, dando a entender que la bacteria probablemente se encuentre en fase de muerte. De igual manera Jacques, *et al* (1999) describe acerca de este tema, que tanto para iturina y fengicinas, la fase estacionaria es la mejor etapa para la producción de estos lipopéptidos por el género *Bacillus* que empieza aproximadamente al quinto día de incubación, que es lo que se pudo observar que al día 5 existe aumento de la expresión tanto para el crecimiento de *B. megaterium* contra *Alternaria* sp., y *Botrytis* sp., certificando que si existe una correlación entre las condiciones en las que se encuentra la bacteria, así como el tiempo en el que transcurre.

Bacillus megaterium, ha sido reconocido por ser un promotor de crecimiento de plantas, pero Ma, *et al.* (2016) en su publicación también afirman que esta especie puede ser considerado como un controlador biológico, aun así, se ha demostrado la presencia tanto de iturinas como de fengicinas para esta especie, teniendo en cuenta que estos lipopéptidos son muy importantes para el antagonismo de una amplia gama de patógenos en la agricultura.

3.4 Expresión génica de FEND e ITUDI en *Bacillus megaterium* en fermentación

En el análisis de expresión génica de FEND e ITUDI en *Bacillus megaterium* mediante RT-qPCR, se monitoreó los niveles de transcritos al día 1, 2, 3 y 5 en fermentación, como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9.

Variación de la expresión génica relativa (EGR) de FEND e ITUDI en *Bacillus megaterium* en fermentación.

Genes	Días en fermentación	Promedio de la variación de la EGR (Lineal)	Promedio de la variación de la EGR (Log2)
FEND	1	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	2	0,85 ± 0,05	-0,24 ± 0,08
	3	1,16 ± 0,04	0,21 ± 0,05
	5	95,14 ± 6,59	6,57 ± 0,10
ITUDI	1	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	2	0,42 ± 0,10	-1,27 ± 0,37
	3	12,96 ± 1,02	3,96 ± 0,12
	5	18,70 ± 0,38	4,23 ± 0,03

Elaborado por: Los autores, 2019.

Se puede evidenciar que existe un aumento de la expresión del gen FEND en *Bacillus megaterium* conforme pasa los días en fermentación y respecto a ITUDI, se pudo apreciar una disminución similar, presentándose en el quinto día la mayor expresión, aun así, fue necesario realizar el análisis estadístico para diferenciar que tan significativo fue este cambio, ya que al parecer en fermentación depende del tiempo para obtener mayores cantidades de cada gen. Es así como en la Tabla 10 se especifica que tan significativos fueron los cambios de la expresión respecto a cada variable.

Tabla 10.

Análisis de varianza para la variable variación de la expresión génica relativa en *Bacillus megaterium* a los diferentes días en fermentación.

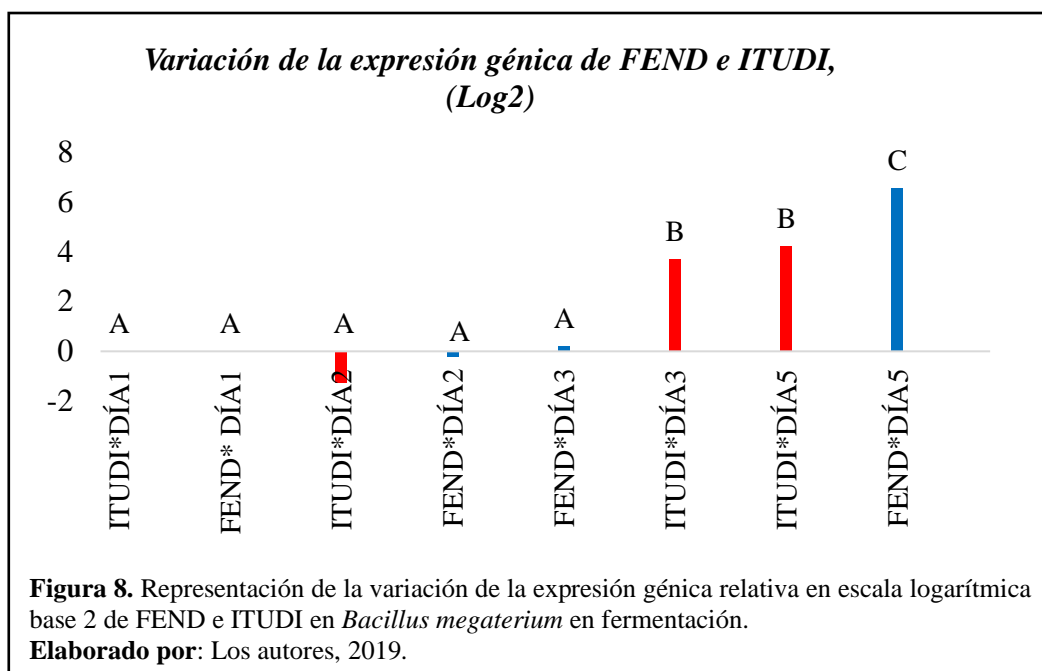
FV	SC	GL	CM	F	p - valor
Genes	13291,24	3	4430,41	794,45	<0,0001
Días	13291,21	4	2243,30	402,26	<0,0001
Error	89,23	16	5,858		
Total	22353,68	23			

Nota: SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: Los autores, 2019.

Según la prueba Post Hoc de Tukey al 5 %, se tiene diferencia significativa para cada variable, dando a entender que tanto los genes como los días de incubación, influyen sobre la expresión génica. En el caso de la variable días, se tiene que al quinto día se obtiene la mayor expresión de ambos lipopéptidos con una media de 56,93 veces más.

Para la variable genes, los dos mejores resultados, pertenecen a los genes expresados de FEND e ITUDI al día 5 con sus medias de 95,14 y 18,71 respectivamente que, para ambos casos, se aprecia un incremento al pasar de los días, y para mayor visualización de los datos en la figura 8 se representan los resultados en fase logarítmica con base 2.



A pesar de que la bacteria biocontroladora no se encuentra frente al patógeno, existe un aumento en la expresión de los genes que codifican para lipopéptidos antimicrobianos y esto puede atribuirse a que el crecimiento se dio mediante fermentación y esta permite una mayor producción de los antimicrobianos, lo cual es resultado de una mayor expresión génica, como lo afirman Beltran-Gracia *et al.* (2017). Hoy en día la fermentación tanto líquida como en estado sólido, se está empleando a nivel industrial para la producción de estos lipopéptidos, ya que ha presentado muy buenos resultados como el aumento en el rendimiento y producción de las bacterias, como lo afirman Marinelli & Molinari (2012) grandes industrias como lo es la farmacéutica emplean la fermentación de microorganismos para la producción de moléculas orgánicas, ya que es un método muy efectivo y permite obtener grandes cantidades de estos, entre los metabolitos que se producen a mayor escala están antibióticos, toxinas, ionóforos, biorreguladores, por lo que es lógico que también se puedan producir metabolitos para uso agrícola en este caso lipopéptidos antimicrobianos mediante fermentación.

También se evidencia claramente que existe un aumento considerable en la expresión de los genes a partir del día 3 en el caso de ITUDI y en el día 5 para FEND, lo cual es lógico debido

a que como lo dicen Beltrán-Gracia, *et al.* (2017) a diferencia de otros metabolitos secundarios bacterianos, la producción de lipopéptidos se induce cuando las células han agotado uno o más nutrientes esenciales, por ejemplo, la producción de surfactina se induce en células en crecimiento activo durante la transición de la fase exponencial a la estacionaria; la síntesis de iturinas está relacionada con la fase estacionaria temprana, y las fengicinas solo se acumulan en el proceso estacionario posterior, que en el caso de *Bacillus megaterium* este se encuentra en fase estacionaria a las 72 horas como lo reportan Collaguazo & Tenorio (2018).

En el estudio realizado por Ariza & Sánchez (2012) en la producción de metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis* como biocontrolador frente a *Fusarium* sp. reportaron mediante HPLC que la mayor concentración de iturinas y fengicinas se dio al día 2 y 5 de fermentación respectivamente, lo cual también concuerda con los resultados obtenidos.

En base a los resultados obtenidos que afirma la hipótesis de investigación la cual afirma que la expresión de los genes FEND e ITUDI de *Bacillus megaterium* aumenta en presencia de patógenos específicos y cuando su crecimiento se da mediante fermentación.

Conclusiones

Bacillus megaterium ejerce un mayor porcentaje de inhibición de crecimiento radial frente a *Alternaria* sp. llegando a un 98,48 % al día 9 de incubación, mientras que frente a *Botrytis* sp. ejerce un máximo de 30 % de inhibición al día 9 de incubación.

La expresión del gen FEND en *Bacillus megaterium* cuando se encuentra solo en crecimiento y frente a *Botrytis* sp. no varía, por el contrario, cuando *Bacillus megaterium* se encuentra frente a *Alternaria* sp. en el día 5 de incubación la expresión del gen FEND aumenta 20,16 veces a partir del día 1, por lo que se considera que al día 5 existe una máxima expresión del gen y este actúa inhibiendo el crecimiento de *Alternaria* sp.

Lo que respecta a la expresión del gen ITUDI, se ha demostrado que *Bacillus megaterium* no solo depende del tiempo para la producción, sino también al estar en una situación de estrés frente al crecimiento en placa contra *Botrytis* sp., puede triplicarse la expresión como demuestran los resultados.

Es evidente que la expresión del gen FEND es notablemente mayor respecto a ITUDI, pero esto no significa una mayor diferencia entre genes, es decir, la actividad antibiótica al menos en el género *Bacillus* con varias especies biocontroladoras, según bibliografía depende indiscutiblemente de la interacción de un conjunto de lipopéptidos, lo que se ha demostrado en este caso, que ambos genes se expresen independientemente del caso, dando a entender que podría elevar su producción de lipopéptidos si *Bacillus megaterium* se encuentra frente a una situación de estrés que lo estimule.

En cuanto a la expresión génica de FEND e ITUDI cuando *Bacillus megaterium* se encuentra en fermentación, al día 5 existe un aumento de expresión en 95,14 veces para el gen FEND a partir del día 1 y para ITUDI al día 3 se presenta un aumento de expresión en 12,96 veces y para el día 5 presenta un aumento de expresión en 18,70 veces, por lo que se concluye que el gen FEND se está expresando en mayor medida y presenta un máxima expresión al día 5.

En definitiva, *Bacillus megaterium* no solo es apto para ser un promotor de crecimiento en plantas como lo señalan otras publicaciones, sino que se ha evidenciado a nivel microbiológico y molecular, que esta bacteria puede ser un potencial controlador biológico para el tratamiento contra patógenos como *Botrytis* sp. y *Alternaria* sp., además, puede llegar a ser utilizado como un productor de lipopéptidos a nivel fermentativo, dando grandes resultados para la investigación e industria.

Recomendaciones

Ampliar la información existente sobre *Bacillus megaterium* como bacteria biocontroladora realizando investigaciones en cuanto a la expresión de otros genes que codifican para la síntesis de lipopéptidos que esta bacteria posee como surfactinas, bacillinas, etc. y que también son considerados como potenciales metabolitos antimicrobianos.

Ampliar la lista de fitopatógenos que *Bacillus megaterium* podría controlar su crecimiento, evaluando con pruebas *in vitro* y en campo.

Elaborar productos biocontroladores para solucionar problemas de fitopatógenos en la agricultura, utilizando a *Bacillus megaterium* como tal o sus metabolitos, en concentraciones específicas, en tiempos ideales y frente a los patógenos correctos.

Referencias

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology* (5th ed.). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2010). Biología Molecular de la Célula. In *Omega*.
- Angulo, V., Sanfuentes, E., Rodríguez, F., & Sossa, Y. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 338–347. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70093-8](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70093-8)
- Ariza, Y., & Sánchez, L. (2017). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 10(18), 149. <https://doi.org/10.22490/24629448.1003>.
- Ayuke, F., Lagerlöf, J., Jorge, G., Söderlund, S., Muturi, J., Sarosh, B., & Meijer, J. (2017). Effects of biocontrol bacteria and earthworms on the severity of *Alternaria brassicae* disease and the growth of oilseed rape plants (*Brassica napus*). *Applied Soil Ecology*, 117–118, 63–69. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2017.04.019>
- Beltran-Gracia, E., Macedo-Raygoza, G., Villafañá-Rojas, J., Martínez-Rodríguez, A., Chavez-Castrillon, Y., Espinosa-Escalante, F., Beltran-Garcia, M. (2017). Production of Lipopeptides by Fermentation Processes: Endophytic Bacteria, Fermentation Strategies and Easy Methods for Bacterial Selection. In *Fermentation Processes*. <https://doi.org/10.5772/64236>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Campaña, A. (2018). Identificación microbiológica y molecular mediante PCR en tiempo real

- de dos bacterias del género *Bacillus*, de interés agrobiotecnológico. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15698/1/UPS-QT12847.pdf>
- Chen, L., Wang, N., Wang, X., Hu, J., & Wang, S. (2010). Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. *Bioresource Technology*, 101(22), 8822–8827. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.054>
- Chen, S., Zhang, M., Wang, J., Lv, D., Ma, Y., Zhou, B., & Wang, B. (2017). Biocontrol effects of *Brevibacillus laterosporus* AMCC100017 on potato common scab and its impact on rhizosphere bacterial communities. *Biological Control*, 106, 89–98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.005>
- Chen, Y., Gao, X., Chen, Y., Qin, H., Huang, L., & Han, Q. (2014). Inhibitory efficacy of endophytic *Bacillus subtilis* EDR4 against *Sclerotinia sclerotiorum* on rapeseed. *Biological Control*, 78, 67–66. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.07.012>
- Chiluisa-Utreras, V., Vaca, I., Chicaiza, O., & Peñaherrera, S. (2017). Analysis of the expression of β -actin, RuANS and RuMYB10 genes involved in the biosynthesis of anthocyanin using RT-qPCR in *Rubus niveus* in the Rumiñahui Canton. *Journal of Berry Research*, 7, 195–201. <https://doi.org/10.3233/JBR-170156>
- Collaguazo, L., & Tenorio, M. (2018). Elaboración de biopreparados a base de *Bacillus* sp. para controlar *Alternaria* sp. en el cultivo de *Brassica oleracea* var. Universidad Politécnica Salesiana.
- Constantinescu, F. (2017). Biocontrol of soil borne fungi in tomato crop by using beneficial *Bacillus subtilis* strains - PubAg. *Acta Horticulturae*, 914, 381–384.
- DeFilippi, S., Groulx, E., Megalla, M., Mohamed, R., & Avis, T. (2018). Fungal Competitors Affect Production of Antimicrobial Lipopeptides in *Bacillus subtilis* Strain B9–5. *Journal*

- of Chemical Ecology*, 44(4), 374–383. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0938-0>
- Dragovoz, I., Tkachuk, D., Avdeeva, L., Grabova, A., & Zelena, L. (2016). Antifungal activity and gene expression of lipopeptide antibiotics in strains of genus *Bacillus*. *Biopolymers and Cell*, 32(1), 41–48. <https://doi.org/10.7124/bc.00090b>
- Elad, Y., Pertot, I., Cotes Prado, A., & Stewart, A. (2016). Plant Hosts of *Botrytis* spp. in *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (pp. 413–486). https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_20
- El-Gremi, S., Draz, I., & Youssef, W. (2017). Biological control of pathogens associated with kernel black point disease of wheat. *Crop Protection*, 91, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.08.034>
- Evrard, A., Boulle, N., & Lutfalla, G. (2010). Real-time PCR. In *Nanoscience: Nanobiotechnology and Nanobiology*. https://doi.org/10.1007/978-3-540-88633-4_15
- Fan, H., Ru, J., Zhang, Y., Wang, Q., & Li, Y. (2017). Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiological Research*, 199, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.03.004>
- FAO. (2001). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. ISSN 0251-1371. www.fao.org/3/a-x9800s.pdf
- FAO. (2013). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. ISSN 0251-1371. www.fao.org/23/a-x97800s.pdf
- FAO. (2018). Tendencias y perspectivas mundiales de los plaguicidas. <http://www.fao.org/agriculture/crops/noticias-eventosboletines/detail/es/item/430150/ico>
- Fernández-Piqueras, J., Fernández Peralta, A., & Santos Hernández, J. (2000). Genética. Editorial Ariel. DF México.

- Fundación Hondureña de Investigación Agrícola-FHIA. (2007). Deterioro Poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias. In *Apartado Postal*. Tegucigalpa.
- Gadhawe, K., Finch, P., Gibson, T., & Gange, A. (2016). Plant growth-promoting *Bacillus suppress Brevicoryne brassicae* field infestation and trigger density dependent and density independent natural enemy responses. *Journal of Pest Science*, 89(4), 985–992. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0721-8>
- García, M. (2016). Nuevas estrategias analíticas de extracciones selectivas en continuo acopladas a la cromatografía de líquidos para la determinación de antibióticos en muestras biológicas (departamento de ciencias analíticas facultad de ciencias). Retrieved from http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/tesisuned:Ciencias-Magarcia/GARCIA_MAYOR_M_Asuncion_Tesis.pdf
- Geissler, M., Oellig, C., Moss, K., Schwack, W., Henkel, M., & Hausmann, R. (2017). High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) for the simultaneous quantification of the cyclic lipopeptides Surfactin, Iturin A and Fengycin in culture samples of *Bacillus* species. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1044–1045, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.11.013>
- González-Jaramillo, L., Aranda, F., Teruel, J., Villegas-Escobar, V., & Ortiz, A. (2017). Antimycotic activity of fengycin C biosurfactant and its interaction with phosphatidylcholine model membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 156, 114–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.021>
- Gu, Y., Xu, X., Wu, Y., Niu, T., Liu, Y., Li, J., & Liu, L. (2018). Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications. *Metabolic Engineering*, 50, 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.006>
- Hang, N., Oh, S., Kim, G., Hur, J. S., & Koh, Y. (2005). *Bacillus subtilis* S1-0210 as a

- biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. *Plant Pathology Journal*, Vol. 21, pp. 59–63. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2005.21.1.059>
- Hashem, A., & Allah, F. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Heuson, E., Etchegaray, A., Filipe, S. L., Beretta, D., Chevalier, M., Phalip, V., & Coutte, F. (2019). Screening of Lipopeptide-Producing Strains of *Bacillus* sp. Using a New Automated and Sensitive Fluorescence Detection Method. *Biotechnology Journal*, 14(4). <https://doi.org/10.1002/biot.201800314>
- Huang, Y., Wu, Z., He, Y., Ye, B., & Li, C. (2017). Rhizospheric *Bacillus subtilis* exhibits biocontrol effect against *Rhizoctonia solani* in pepper (*Capsicum annuum*). *BioMed Research International*, 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/9397619>
- Jacob, S., Bhagwat, A., & Kelkar-Mane, V. (2015). *Bacillus* species as an intrinsic controller of fungal deterioration of archival documents. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 104, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.05.001>
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., & Thonart, P. (1999). Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77(1–3), 223–234. <https://doi.org/10.1385/ABAB:77:1-3:223>
- Jha, S., Joshi, S., & Geetha, S. (2016). Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 955–964. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.006>
- Juárez, Y. (2017). Detección de *Botrytis cinerea* mediante PCR en cultivos de vid y evaluación

- del biocontrol con *Bacillus subtilis* Q11. Retrieved from <http://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/1116/1/RI005019.pdf>
- Knight, C., Bowman, M., Frederick, L., Day, A., Lee, C., & Dunlap, C. (2018). The first report of antifungal lipopeptide production by a *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* strain. *Microbiological Research*, 216, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.08.001>
- Kumar, A., Saini, S., Wray, V., Nimtz, M., Prakash, A., & Johri, B. (2012). Characterization of an antifungal compound produced by *Bacillus* sp. strain A 5 F that inhibits *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Basic Microbiology*, 52(6), 670–678. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100463>
- Kurniawan, O., Wilson, K., Mohamed, R., & Avis, T. (2018). *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. provide antifungal activity against gray mold and *Alternaria rot* on blueberry fruit. *Biological Control*, 126, 136–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.001>
- Lengyel, I. (2018). Oscilaciones y ruido en la expresión genética: diálogos entre teoría y experimentos. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6488_Lengyel
- Lisboa, M. (2003). Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en *Vid vinífera*. Universidad de Talca.
- Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ma, Y., Kong, Q., Qin, C., Chen, Y., Chen, Y., Lv, R., & Zhou, G. (2016). Identification of

- lipopeptides in *Bacillus megaterium* by two-step ultrafiltration and LC–ESI–MS/MS. *AMB Express*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0252-6>
- Madigan, M., Martinko, J., & Brock, T. (2006). *Brock biology of microorganisms* (11th ed.). Pearson Prentice Hall.
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., & Ptak, M. (1992). Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie*, 74(12), 1047–1051. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90002-V](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90002-V)
- Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., & Van-Elsas, J. (2015). Ecology of *Bacillaceae*. *Microbiology Spectrum*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0017-2013>
- Mannaa, M., & Kim, K. (2018). Biocontrol activity of volatile-producing *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas protegens* against *Aspergillus* and *Penicillium* spp. predominant in stored rice grains: Study II. *Mycobiology*, 46(1), 52–63. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1454015>.
- Marinelli, F., & Molinari, F. (2012). Las fermentaciones en la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico. Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia, 12(5), 20–25. <https://doi.org/es/monoranf.v0i0.1314>
- Martínez, H., Osorio, E., Estrada, B., López, J., Varela, S., & Torres, J. (2017). Control biológico de fitopatógenos mediante aislados de *Trichoderma* spp. *Agro Productividad*, 10(3), 9–14.
- Morales, J. (2019). Expresión génica de flavanona 3-hidroxilasa (F3H) y p-cumaril ester 3-hidroxilasa (C3H) en el fruto de *Solanum caripense* Dunal mediante RT-PCR y RT-qPCR” Presentada. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Ndlovu, T., Rautenbach, M., Khan, S., & Khan, W. (2017). Variants of lipopeptides and

- glycolipids produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* cultured in different carbon substrates. *AMB Express*, 7(1).
<https://doi.org/10.1186/s13568-017-0367-4>
- Olascoaga, A., & Lopez, P. (2012). Reacción en cadena de la polimerasa y su implementación en un laboratorio de diagnóstico. Retrieved from
<https://supac.org.uy/images/Revistas/R51.pdf#page=23>
- Parker, J., & Walsh, C. (2016). Stereochemical Outcome at Four Stereogenic Centers during Conversion of Prephenate to Tetrahydrotyrosine by BacABGF in the Bacilysin Pathway. *Biochemistry*, 51(28), 5622–5632. <https://doi.org/10.1021/bi3006362>
- Peña, R., & Páex, J. (2010). Hongos Fitopatógenos. *Fitopatología*, 8(2), 6–12.
- Pérez-Martínez, S. (2016). Induction of tomato resistance to *Alternaria solani* Sor. by biological and chemical activators in the field. *Ec. Rev. Protección Veg*, 31(3), 201–212.
- Prescott, L., Harley, J., Klein, D., & Gamazo de la Rasilla, C. (1999). Microbiología (4th ed.). Boston: WCB McGraw Hill.
- Proaño, I. (2014). Identificación de hongos fitopatógenos relacionados con la marchitez de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en la provincia de Bolívar mediante microscopía óptica y PCR. Quito, EC: Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura, 2014. 95 p.
- Ramakers, C., Ruijter, J., Lekanne Deprez, R., & Moorman, A. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339(1), 62–66. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4)
- Rivas, L. (2015). *Alternaria* sp. *Rev Chilena Infectol*, 31(5), 605–606.
- Romero, D., De Vicente, A., Rakotoaly, R., Dufour, S., Veening, J., Arrebola, E., & Pérez-

- García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 430–440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>
- Sajitha, K., & Dev, S. (2016). Quantification of antifungal lipopeptide gene expression levels in *Bacillus subtilis* B1 during antagonism against sapstain fungus on rubberwood. *Biological Control*, 96, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.007>
- Sánchez-Pila, A. (2016). Importance of *Bacillus subtilis* lipopeptides in the biological control of diseases in crops of high economic value. *Revista Bio Natura*, 1(3), 1–4.
- Saravanakumar, D., Thomas, A., & Banwarie, N. (2019). Antagonistic potential of lipopeptide producing *Bacillus amyloliquefaciens* against major vegetable pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 154(2), 319–335. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01658>
- Savadogo, A., Tapi, A., Chollet, M., Wathelet, B., Traoré, A., & Jacques, P. (2011). Identification of surfactin producing strains in Soumbala and Bikalga fermented condiments using Polymerase Chain Reaction and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry methods. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), 299–306. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2011.09.022>
- Schmittgen, T. (2006). Quantitative gene expression by real-time PCR: a complete protocol. In *Real-time PCR*. <https://doi.org/10.4016/17251.01>
- Solera del Río, R. (2014). Aspectos biológicos de la digestión aeróbica. Mundi-Prensa.
- Tomas-Grau, R., Requena-Serra, F., Hael-Conrad, V., Martínez-Zamora, M., Guerrero-Molina, M., & Díaz-Ricci, J. (2018). Soft mechanical stimulation induces a defense response against *Botrytis cinerea* in strawberry. *Plant Cell Reports*, 37(2), 239–250. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2226-9>

- Tortoló-Cabañas, K., & Bell-García, A. (2015). Producción de proteínas recombinantes en *Bacillus megaterium*: estado del arte. *ICIDCA*, 49(1), 0138–6204. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223136961004>
- Tsuey, L., Chyi, C., Hui, F., Cheng, W., Guang, L., Shih, H., & Shih, L. (2005). Functional analysis of fengycin synthetase FenD. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1730(2), 159–164. <https://doi.org/10.1016/J.BBAEXP.2005.02.005>
- Vanegas, M. (2015). Guías para el laboratorio de bacteriología (1st ed.). Bogotá: Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Biológicas, Ediciones Unidas.
- Velho, R., Tsai, S., Brandelli, A., Ritter, A., Leães, F., & Caldas, D. (2015). Expression of essential genes for biosynthesis of antimicrobial peptides of *Bacillus* is modulated by inactivated cells of target microorganisms. *Research in Microbiology*, 167(2), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.10.005>
- Villa-Rodríguez, E., Parra-Cota, F., Castro-Longoria, E., López-Cervantes, J., & De los Santos-Villalobos, S. (2019). *Bacillus subtilis* TE3: A promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum). *Biological Control*, 132, 135–143. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2019.02.012>
- Villarreal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra, F., & De los Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1), 95–130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Wang, T., Liang, Y., Wu, M., Chen, Z., Lin, J., & Lirong, Y. (2015). Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese Journal of Chemical Engineering*,

23(4), 744–754. <https://doi.org/10.1016/J.CJCHE.2014.05.020>

- Wang, X., Wang, J., Jin, P., & Zheng, Y. (2013). Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus rot* in peach fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 164, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.010>
- Wei, C., Ruey, S., & Yu, W. (2015). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158–169. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2015.07.009>
- Withman, W. (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. In N. Krieg, J. Staley, D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, & W. Whitman (Eds.), *Mycoses* (2nd ed., Vol. 28). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1985.tb02120.x>
- Yang, D., Bi, Y., Chen, X., Ge, Y., & Zhao, J. (2006). Biological control of postharvest diseases with *Bacillus subtilis* (B1 strain) on muskmelons (*Cucumis melo* L. cv. Yindi). *Acta Horticulturae*, 712 II, 735–739.
- Yang, D., Wang, B., Wang, J., Chen, Y., & Zhou, M. (2009). Activity and efficacy of *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and *Sclerotinia stem* rot of rape. *Biological Control*, 51(1), 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.021>
- Yaseen, Y., Gancel, F., Béchet, M., Drider, D., & Jacques, P. (2017). Study of the correlation between fengycin promoter expression and its production by *Bacillus subtilis* under different culture conditions and the impact on surfactin production. *Archives of Microbiology*, 199(10), 1371–1382. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1406-x>
- Zalila-Kolsi, I., Mahmoud, A. Ben, Ali, H., Sellami, S., Nasfi, Z., Tounsi, S., & Jamoussi, K. (2016). Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum). *Microbiological*

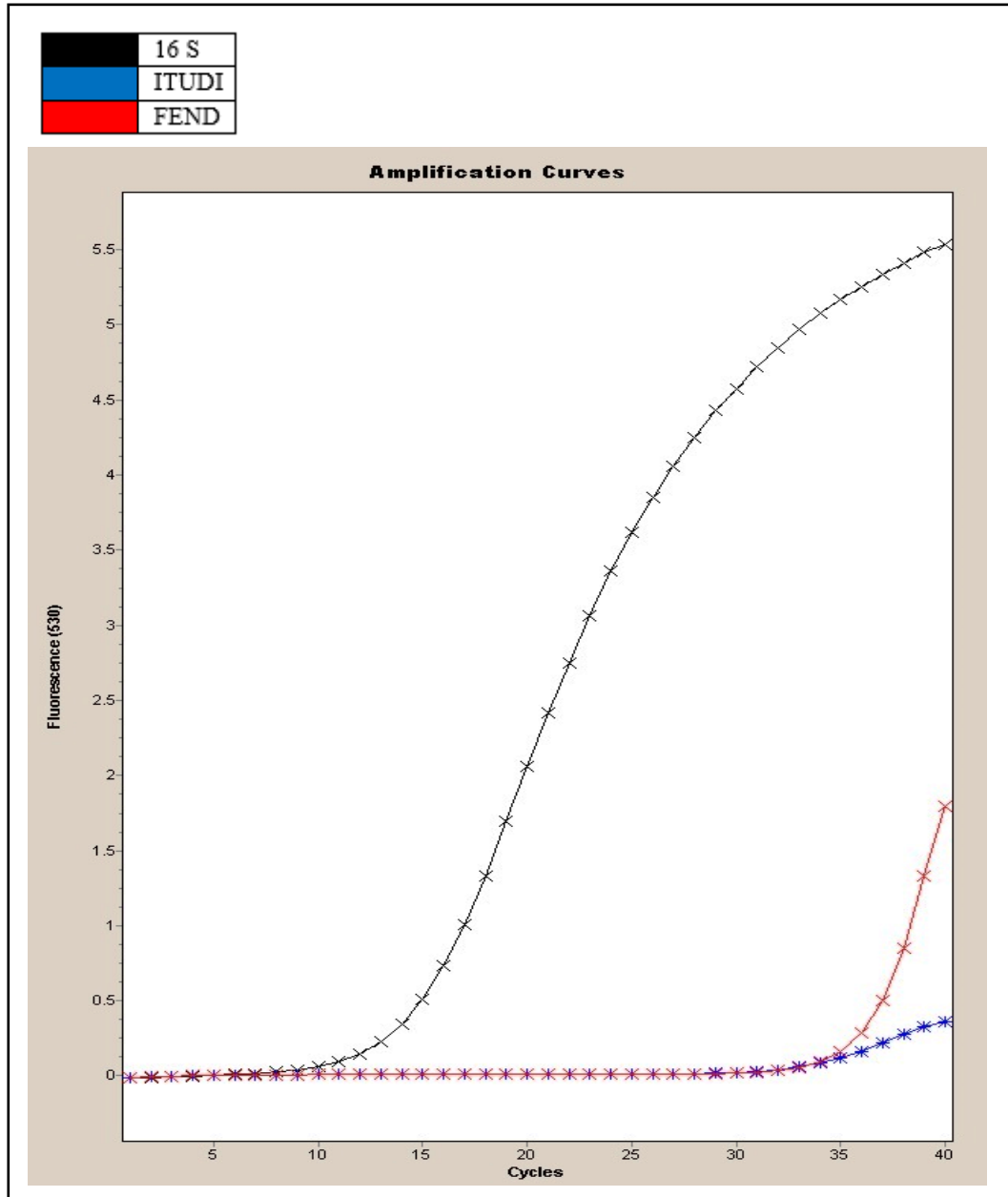
Research, 192, 148–158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.012>

Zhao, Q., Ran, W., Wang, H., Li, X., Shen, Q., Shen, S., & Xu, Y. (2013). Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IVI. *BioControl*, 58(2), 283–292. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9496-5>.

Anexos

Anexo 1.

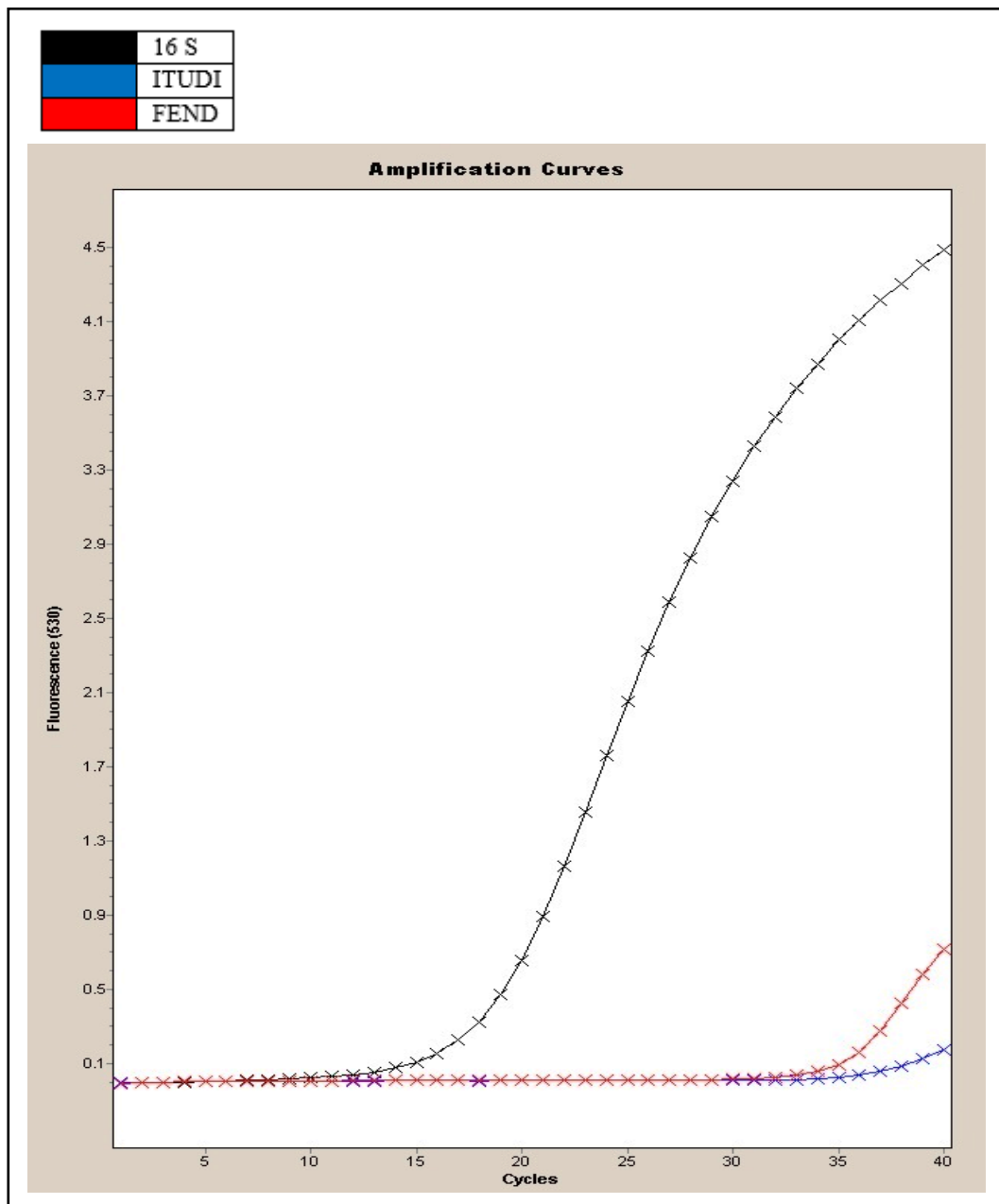
Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de *Bacillus megaterium* al día 1.



Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 2.

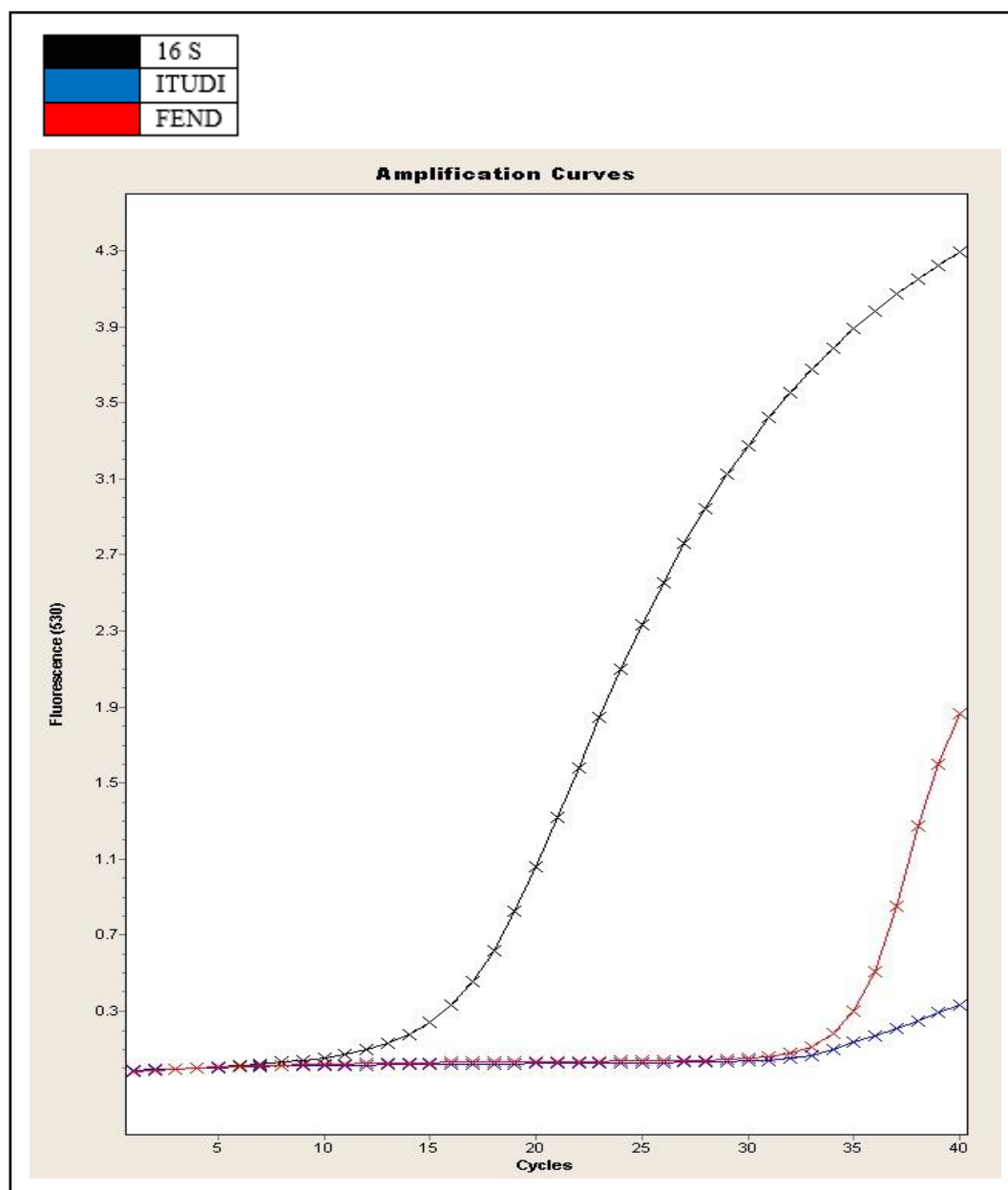
Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de *Bacillus megaterium* al día 5.



Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 3.

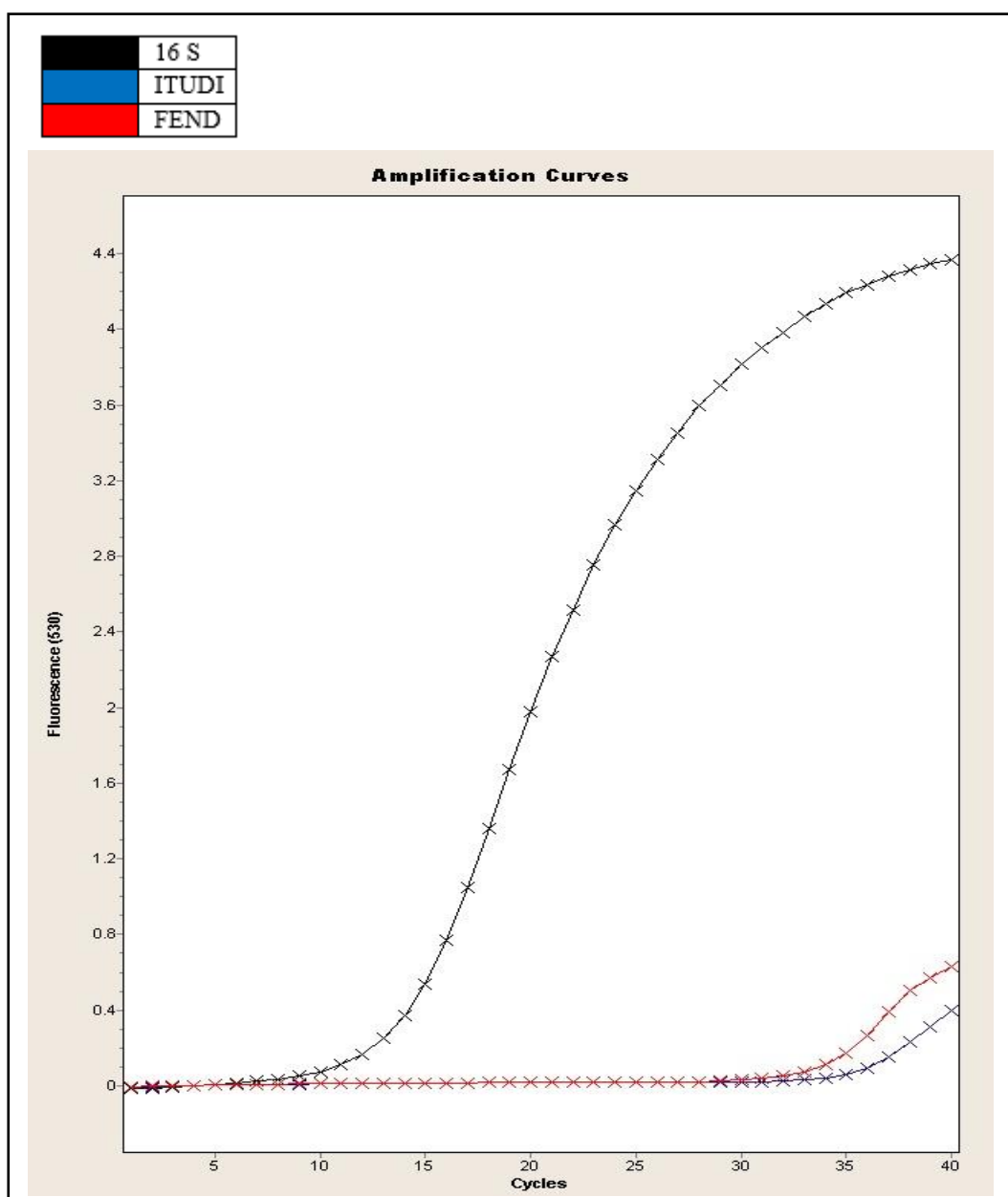
Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de *Bacillus megaterium* al día 9.



Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 4.

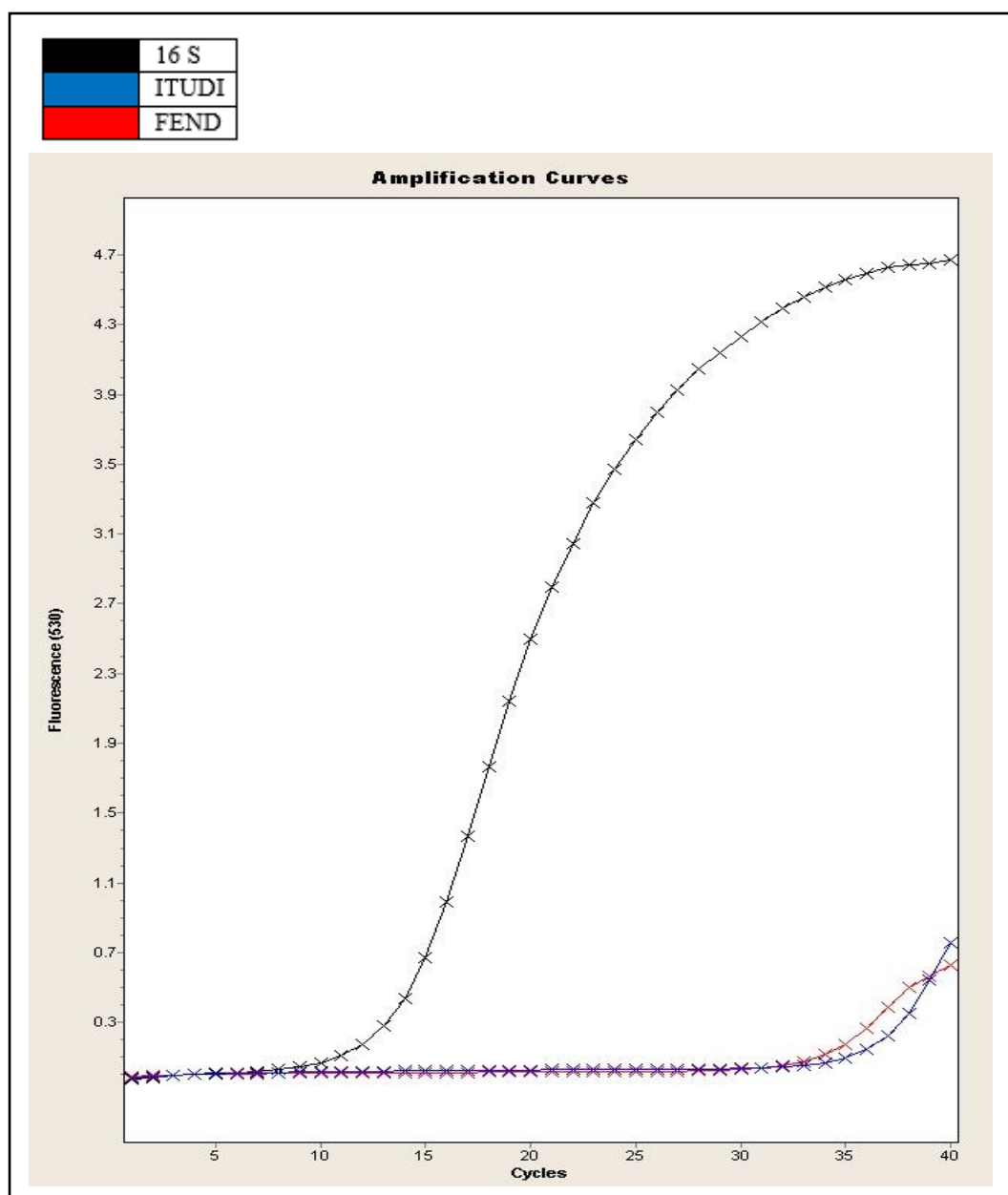
Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de *Bacillus megaterium* frente *Botrytis* sp., al día 1.



Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 5.

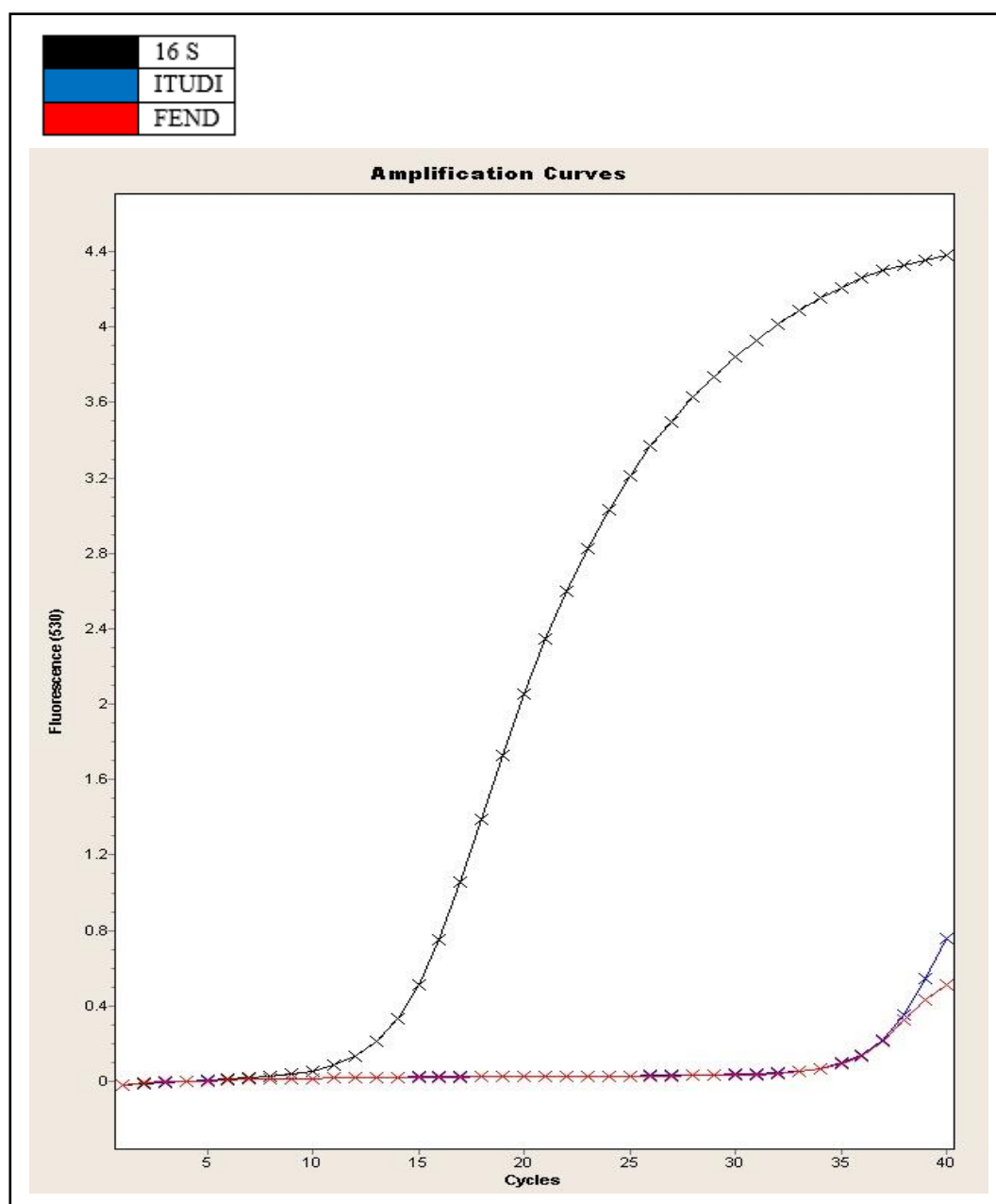
Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de *Bacillus megaterium* frente *Botrytis* sp., al día 5.



Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 6.

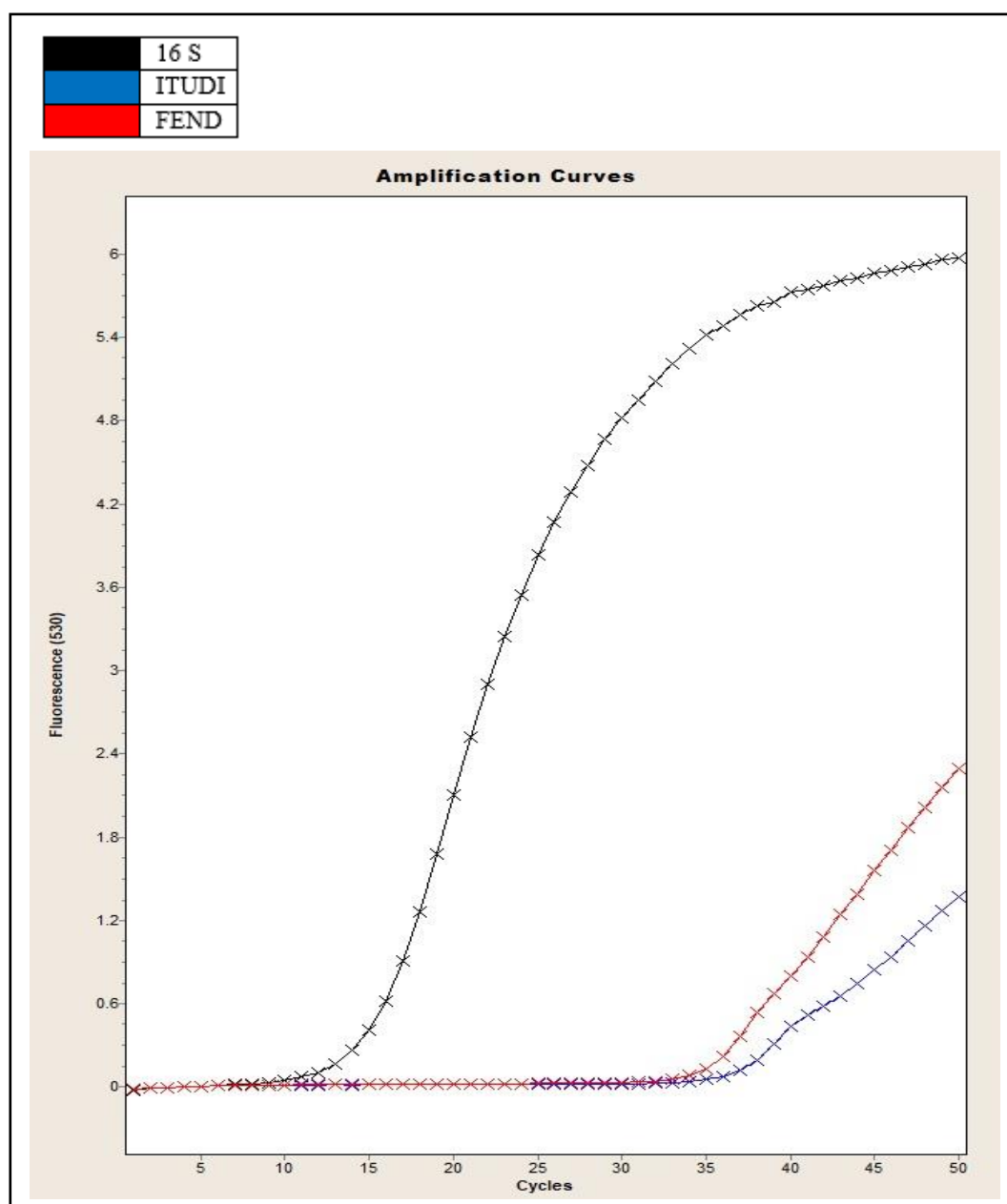
Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de *Bacillus megaterium* frente *Botrytis* sp., al día 9.



Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 7.

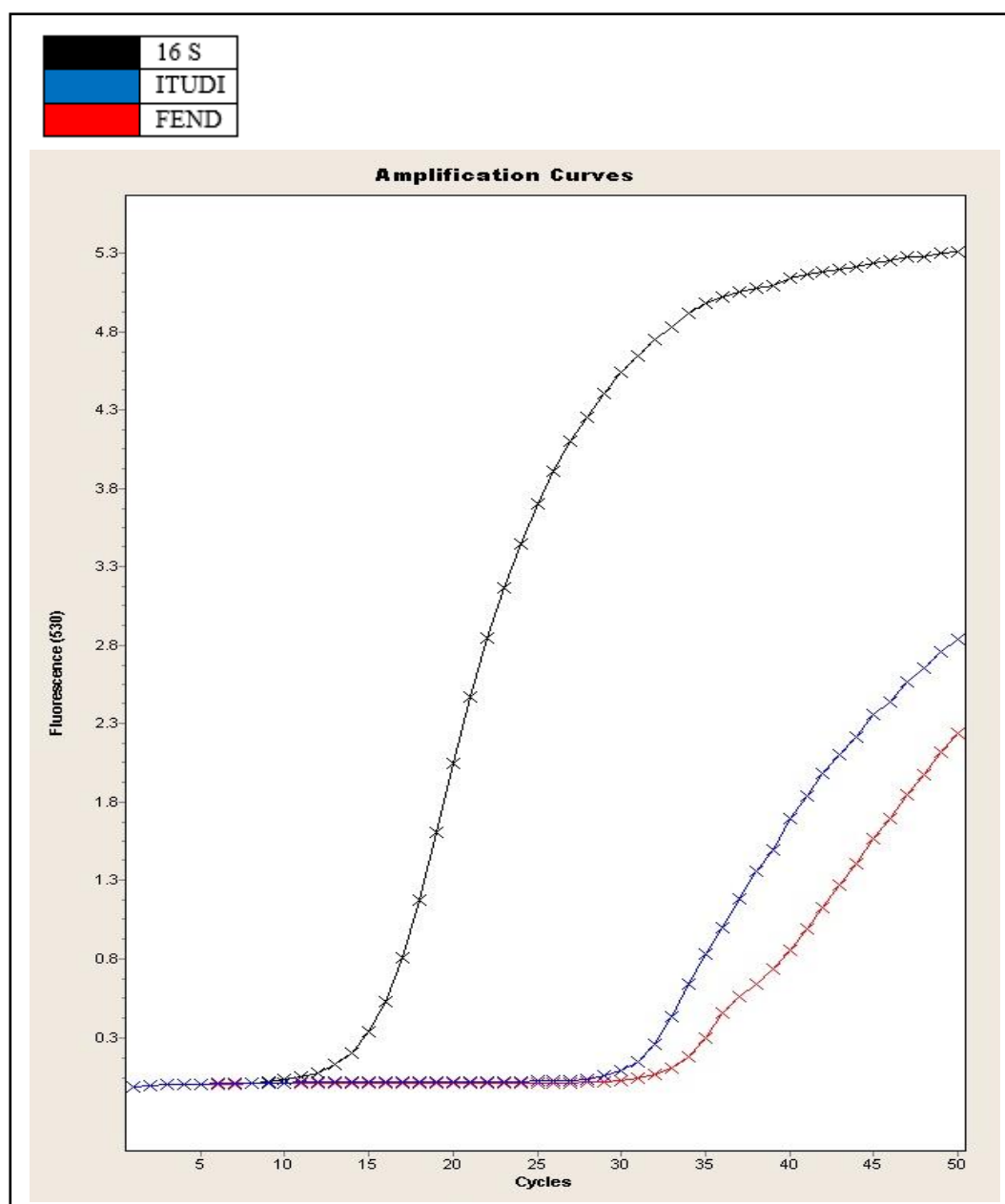
Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de *Bacillus megaterium* frente *Alternaria* sp., al día 1.



Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 8.

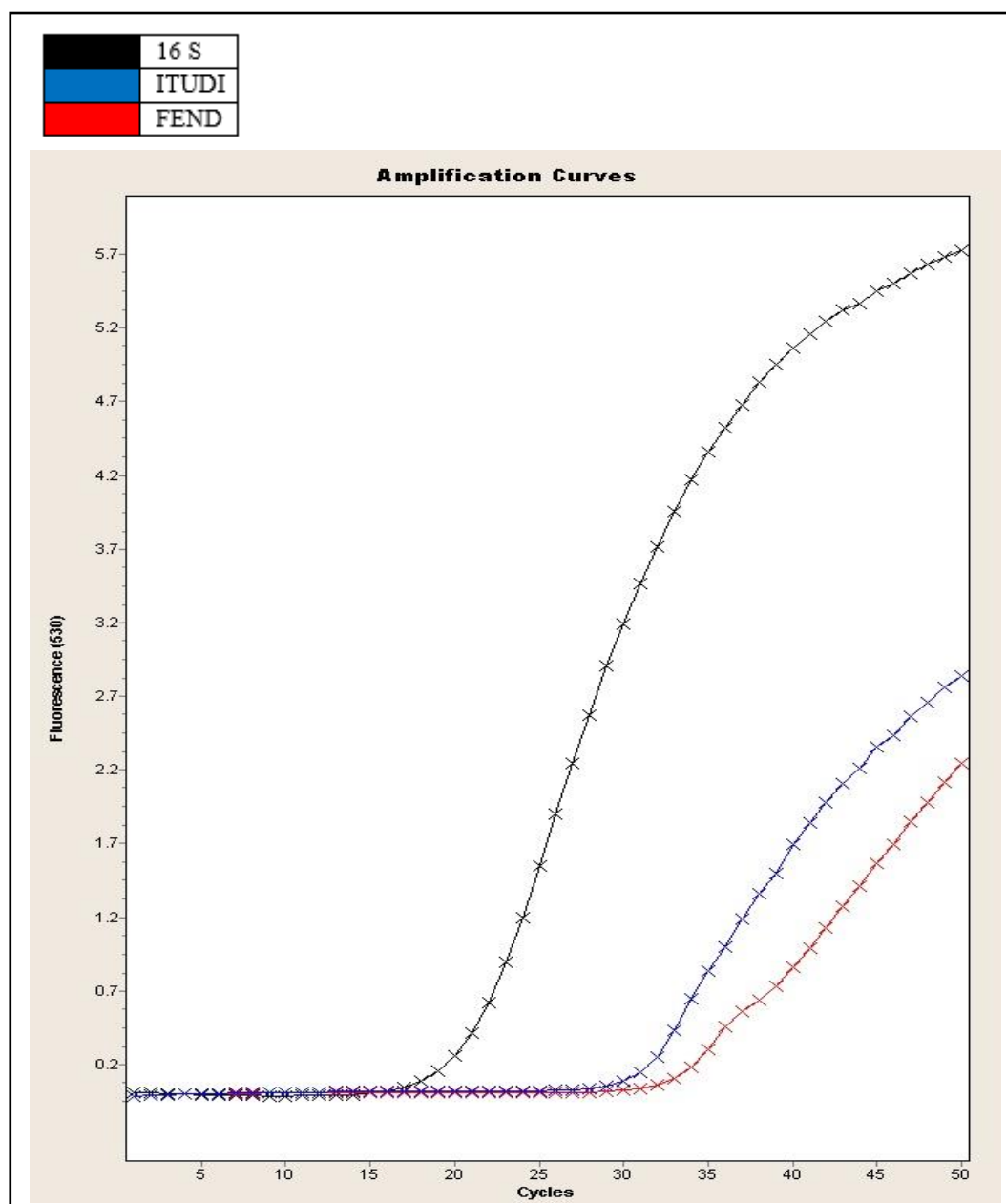
Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de *Bacillus megaterium* frente *Alternaria* sp., al día 5.



Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 9.

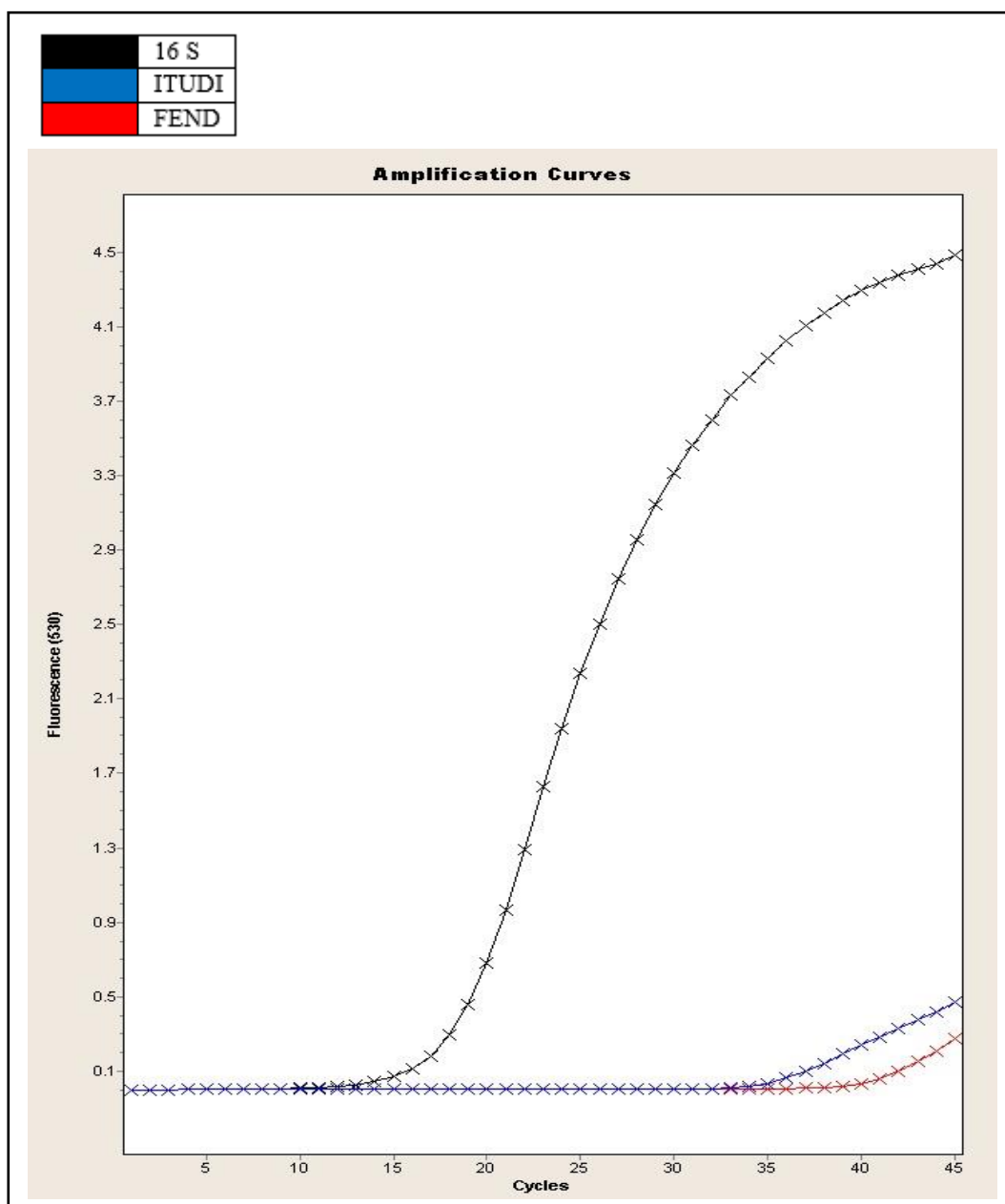
Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de *Bacillus megaterium* frente *Alternaria* sp., al día 9.



Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 10.

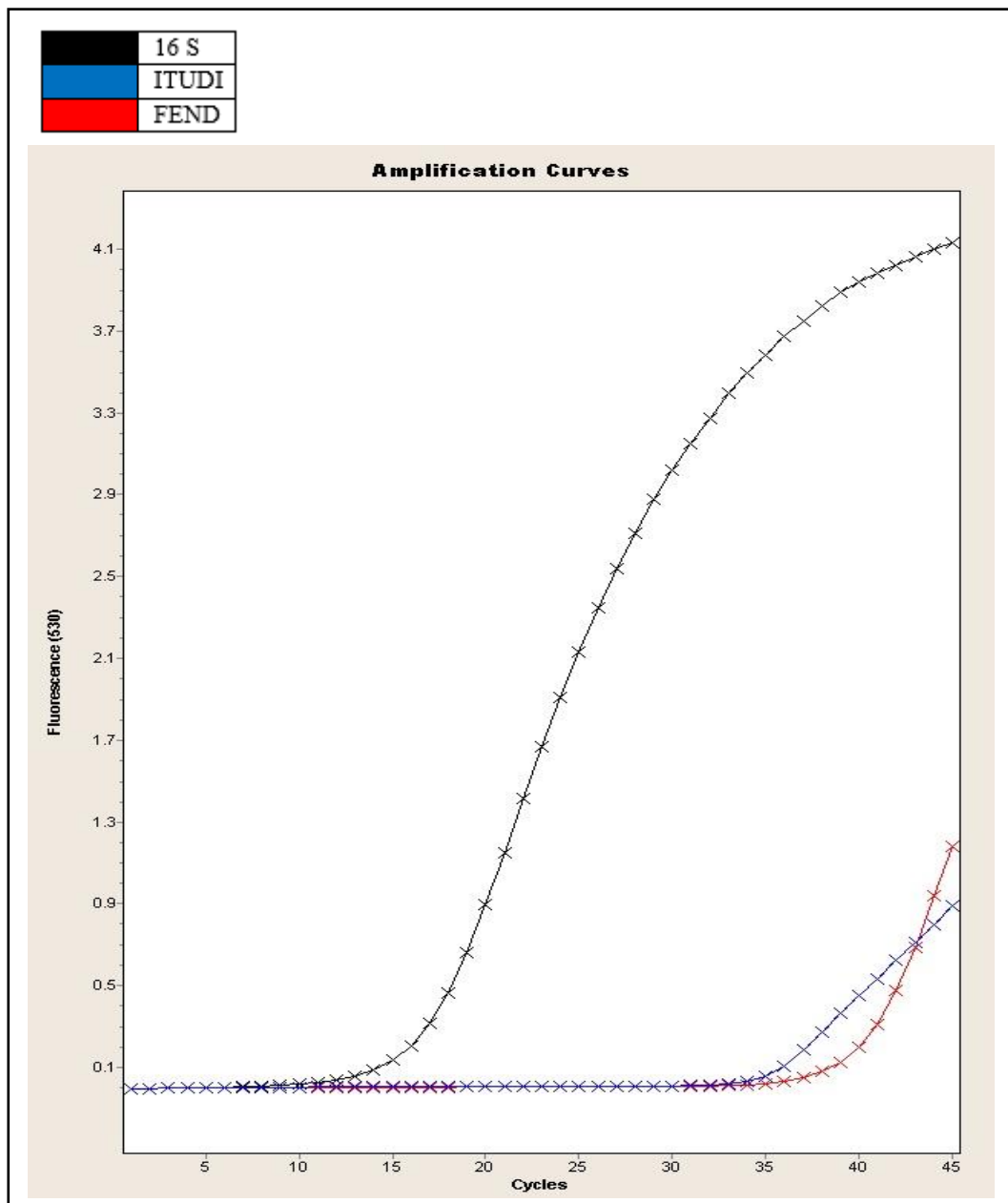
Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de *Bacillus megaterium* en fermentación al día 1.



Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 11.

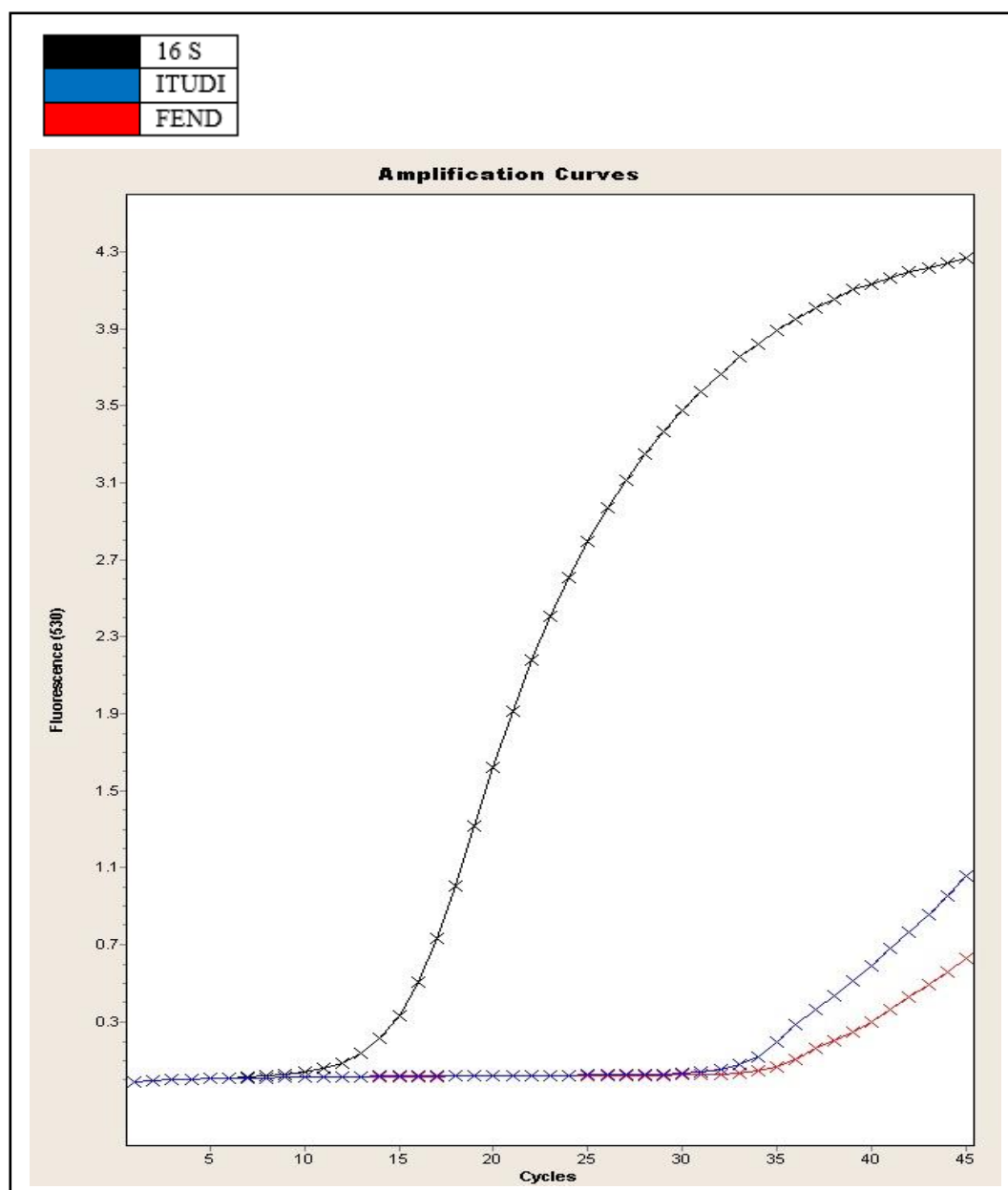
Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de *Bacillus megaterium* en fermentación al día 2.



Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 12.

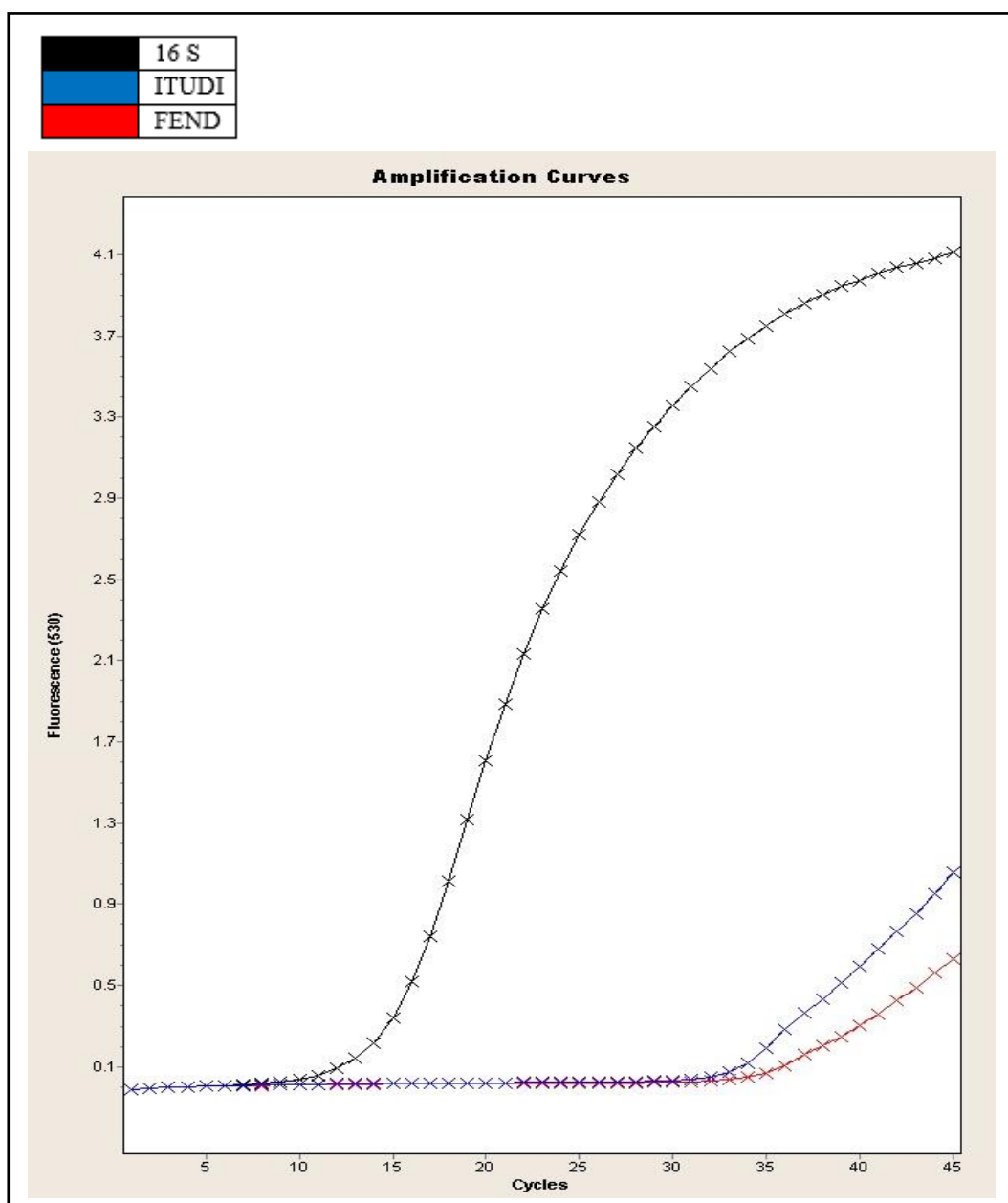
Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de *Bacillus megaterium* en fermentación al día 3.



Elaborado por: Los autores, 2019.

Anexo 13.

Curva de amplificación qPCR del gen 16S, FEND, ITUDI de *Bacillus megaterium* en fermentación al día 5.



Elaborado por: Los autores, 2019.